Mikromethode zur Strukturaufklärung ungesättigter Alkohole und ihre Anwendung auf den Sexuallockstoff des Seidenspinners (Bombyx mori)

Von

DANKWART STAMM

1962

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. A. BUTENANDT)

Mikromethode zur Strukturaufklärung ungesättigter Alkohole und ihre Anwendung auf den Sexuallockstoff des Seidenspinners (Bombyx mori)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Dr. med. DANKWART STAMM
aus Kirn an der Nahe

Oktober 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. h. c. A. Butenandt

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1962

Herrn Professor *Butenandt*
danke ich herzlich für die Überlassung
dieses Themas und die
vielfältige persönliche Förderung
während der Bearbeitung.

Herr Doktor *Hecker*
war so freundlich, mich in die
Problemstellung einzuführen;
dafür bin ich ihm, ebenso
wie für die wertvollen Diskussionen
sehr verbunden.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546824_0027

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 7

Ziel und Planung der Arbeit 10

Die Modellsubstanzen 14

Die Spaltprodukte 17

1. 4′-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester geradkettiger ω-Hydroxy-fettsäure-methylester 17
2. 4′-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester methylverzweigter ω-Hydroxy-fettsäure-methylester 20
3. 4′-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester der ω-Hydroxy-methyl-ketone 21
4. Dicarbonsäuren 23
5. Monocarbonsäuren 25
6. Ketosäuren 25
7. Ketone 26

Die Identifizierung der Spaltprodukte 27

1. Identifizierung der 4′-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester 27
2. Identifizierung der Monocarbonsäuren 27
3. Identifizierung der Dicarbonsäuren 31
4. Identifizierung der Ketosäuren und Ketone 31

Mikromethode zur oxydativen Spaltung 32

Ergebnisse und Diskussion 39

Beschreibung der Versuche 45

Zusammenfassung 57

Literaturverzeichnis 59

Lebenslauf 61

Einleitung

Bei einer großen Zahl von Nachtfaltern lockt das Weibchen durch eine artspezifische Substanz die Männchen zur Kopulation[1] an. Es werden Anlockungen aus Entfernungen von einigen Kilometern mitgeteilt[2, 3]. Die Sexuallockstoffe der Nachtfalter sind sicher Wirkstoffe, da sie die physiologische Reaktion bereits in geringen Konzentrationen auslösen. Sie lassen sich aber in keine der bekannten Wirkstoffgruppen, die Fermente, Vitamine oder Hormone einordnen. Am nächsten stehen sie noch den Hormonen, sie dürfen aber nicht zu ihnen gerechnet werden, wie das früher einmal vorgeschlagen wurde[4]; denn unter einem Hormon versteht man einen Wirkstoff, der im natürlichen Geschehen in einem Teil eines Organismus gebildet wird und in einem anderen Teil desselben Organismus die ihn kennzeichnenden Wirkungen entfaltet[5]. Es wurde darum von Karlson und Lüscher kürzlich der Vorschlag gemacht, alle Wirkstoffe, die nach ihrer Bildung in einem Organismus nach außen abgegeben werden und in einem zweiten Organismus der selben Art ganz spezifische Wirkungen auslösen, als „Pheromone“[6] zu bezeichnen. Der Name wird vom griechischen „pherein“ — übertragen, und „horman“ — erregen, anregen hergeleitet. Die Pheromone findet man nicht nur bei Insekten, wie z. B. die Sexuallockstoffe der Schmetterlinge[1], der Schaben[7], die Königinsubstanz der Bienen[8] und der Ameisen[9] und die Wirkstoffe der Termiten-Geschlechtstiere[10], sondern auch als Sexuallockstoffe bei den Crustaceen[11] und bei Wirbeltieren als Schreckstoff der Ellritzen[12]; vielleicht gehören auch die Substanzen zur Territorien-Markierung der Raubtiere dazu. Zunächst bleibt unverständlich, warum die Gamone und Termone nicht unter die Pheromone eingereiht werden, sie genügen der Definition.

Das erste Pheromon, von dem man die biologischen Wirkungen sehr genau kennt[2] und jetzt auch die chemische Struktur[13] ermitteln konnte,

ist der Sexuallockstoff des Seidenspinners, Bombyx mori, das Bombykol.

Die biochemische Bearbeitung der Sexuallockstoffe wurde zuerst von Collins und Potts am Schwammspinner, dann von A. Butenandt am Bombyx mori in Angriff genommen[14]. Er wählte den seit Jahrtausenden vom Menschen zur Gewinnung der Seide gezüchteten Falter, weil er sich leicht in großen Mengen beschaffen läßt und gut im Laboratorium gehalten werden kann. Nach dem Schlüpfen aus dem Kokon nimmt er keine Nahrung mehr auf und ist nicht flugfähig. Das Weibchen gibt den Lockstoff aus besonderen Drüsen an dem Hinterende des Abdomens ab.

Um aus den Rohextrakten einen Wirkstoff unbekannter chemischer Struktur zu isolieren, benötigt man einen quantitativen biologischen Test, durch den man den Erfolg der Fraktionierung feststellen kann. Man nutzt dazu die erregende Wirkung des Sexuallockstoffes auf das Faltermännchen aus[2]. Von einem kleinen Teil der zu testenden Fraktion wird eine Lösung bestimmter Konzentration in Petroläther hergestellt. Ein hineingetauchter Glasstab wird nach Verdunsten des Petroläthers einem ruhig in seiner Zuchtschale sitzenden Männchen vorgehalten, ohne es selbst zu berühren oder zu beunruhigen. Reagiert es mit einem charakteristischen Schwingen der Flügel, so ist biologisch wirksame Substanz in der Fraktion enthalten. Zur quantitativen biologischen Bestimmung des Lockstoffgehaltes der einzelnen Fraktionen wird eine Verdünnungsreihe nach Zehnerpotenzen hergestellt und jede Lösung in der beschriebenen Weise bei mindestens 20 Tieren ausgetestet. Diejenige Konzentration (Gewichtseinheit pro 1 ccm Petroläther), durch die noch mindestens die Hälfte der Tiere erregt wird, bezeichnet man als die Lockstoffeinheit (L.E.). Nach den ersten Reinigungsschritten gibt 1 γ/ml die Lockstoffeinheit.

Aufbauend auf den reichen und wertvollen Erfahrungen früherer Untersucher aus dem Arbeitskreis von A. Butenandt[2, 16], konnte R. Beckmann 12 mg des reinen 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Lockstoffes nach Aufarbeitung von 500 000 Duftdrüsen isolieren[13]. Der aus dem Derivat freigesetzte Lockstoffalkohol, das Bombykol, zeigt eine außerordentlich hohe biologische Wirksamkeit: er gibt die L.E. mit 10^{-10} γ/ml. Die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4) wurde zur Isolierung des Sexuallockstoffes entwickelt[15]. Die günstigen Eigenschaften ihrer farbigen und ausgezeichnet kristallisierenden Ester haben die

Isolierung eines kristallisierten Lockstoffderivates ermöglicht und zur Entdeckung der für den Sexuallockstoff charakteristischen UV-Absorption bei 231 mμ geführt[2, 16, 17]. Ihr größter Vorzug ist die Spaltbarkeit der Esterbindung unter milden Bedingungen, die für den Test Voraussetzung ist, da nur der Alkohol die biologische Wirksamkeit zeigt.

Ziel und Planung der Arbeit

Bei Beginn dieser Untersuchungen lagen aus einer Aufarbeitung von 313000 Duftdrüsen[16,17] 4 Milligramm eines chromatographisch einheitlichen 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters* des Lockstoffes (Schmp. 58—68°) vor, dem noch Siliconöl beigemengt war. Für seine chemische Struktur hatte man folgende Anhaltspunkte:

1. Die Überführbarkeit in einen Ester mit Säurechlorid und Pyridin zeigt, daß der Lockstoff eine primäre oder sekundäre, sicher keine tertiäre Hydroxy-Gruppe enthält.

2. Nach der katalytischen Hydrierung ist der Lockstoff unwirksam, er enthält also Doppelbindungen, von denen zwei nach dem UV-Spektrum in Konjugation stehen.

3. Man kann weiter aus dem UV-Spektrum ersehen, daß der Lockstoff eine aliphatische, sicher keine aromatische Verbindung ist.

4. Bei der Säulenchromatographie und der Papierchromatographie des NABS-esters des Lockstoffes lagen das Retentionsvolumen und der R_f-Wert sehr nahe bei den Werten für den NABS-ester des Dodecylalkohols. Daraus ergibt sich, daß der Lockstoffalkohol mehr als 12 C-Atome enthalten muß.

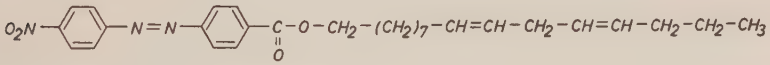
Versuche von W. Gerock[18], der die Fraktion der ungesättigten Fettsäuren aus der Lockstoffaufarbeitung mit Lithium-aluminium-hydrid reduzierte und dadurch im biologischen Test wirksame primäre Alkohole gewinnen konnte, machen es wahrscheinlich, daß auch der natürliche Lockstoff ein primärer Alkohol ist. Außer Sauerstoff konnten in der nach Reduktion wirksamen Säure-Fraktion keine weiteren Heteroatome nachgewiesen werden.

* Im folgenden wird für die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4) die Abkürzung NABS gebraucht.

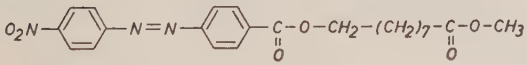
Das damals vorliegende Lockstoffderivat war wegen der Verunreinigung für eine Elementaranalyse ungeeignet; nach weiteren Reinigungsschritten hätte die Menge nicht mehr dafür ausgereicht. Man erhält aus der Elementaranalyse auch nur eine Bruttoformel.

Da es außerordentlich schwierig erschien, größere Mengen des Lockstoffderivates zu gewinnen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Verfahren auszuarbeiten, die bei geringstem Substanzverbrauch weitgehende Einblicke in die Struktur des Lockstoffes gestatten. Es erschien lohnend, das Lockstoffmolekül an den olefinischen Doppelbindungen zu spalten, um so Spaltprodukte zu erhalten, die leichter zu identifizieren sein sollten.

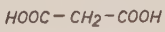
In der Diplomarbeit[19] ist es gelungen, die NABS-ester einfach ungesättigter primärer Alkohole oxydativ zu spalten und die Spaltprodukte nach der Isolierung zu identifizieren. Der weitere Ausbau dieses Verfahrens zur Anwendung auf den Lockstoff machte die Darstellung und den Abbau von NABS-estern mehrfach ungesättigter Alkohole als Modellsubstanzen notwendig. Die oben mitgeteilten Befunde berechtigten zu der Annahme, daß der Lockstoff ein mehrfach ungesättigter, geradkettiger oder verzweigter primärer Alkohol mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen ist. Natürlich ließ sich nicht ausschließen, daß er aliphatische Ringe enthält, jedoch mußte man zunächst den wahrscheinlichsten Möglichkeiten Rechnung tragen. Wenn sich nach einer ersten



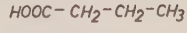
NABS-ester des Linolalkohols



NABS-ester des
ω-Hydroxy-nonansäure-methylester



Malonsäure



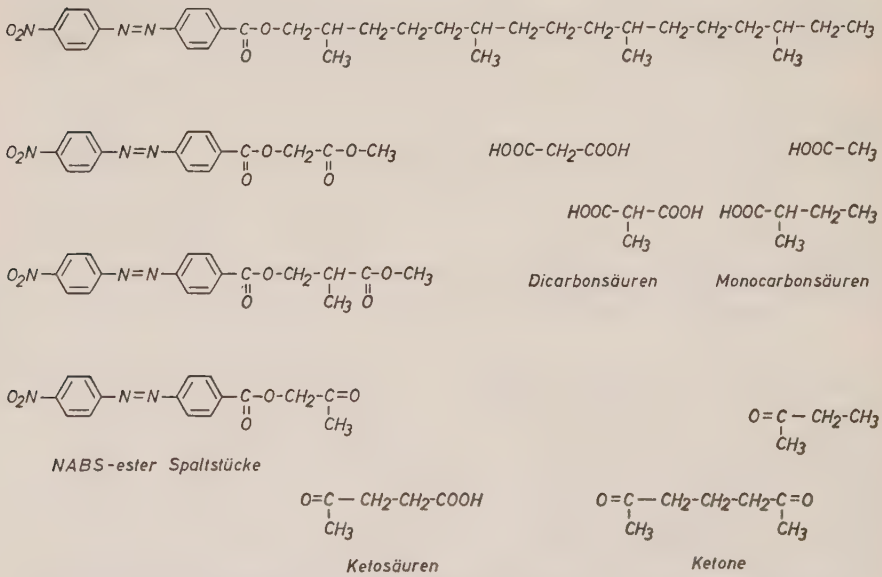
Buttersäure

Die nach der oxydativen Spaltung des NABS-esters des Linolalkohols isolierten Spaltprodukte.

Spaltung des NABS-esters des Lockstoffes die Annahmen einer nicht zyklischen Verbindung als nicht ausreichend erwiesen, hätte man für die Planung weiterer Modellversuche wichtige Anhaltspunkte.

Eine Modellsubstanz für einen geradkettigen mehrfach ungesättigten primären Alkohol wäre der Linolalkohol beziehungsweise dessen NABS-ester. Nach der oxydativen Spaltung mit Kalium-permanganat in Aceton sind als Spaltprodukte die NABS-ester von ω-Hydroxysäuren, die im Laufe der Aufarbeitung mit Diazomethan verestert werden[19], Dicarbonsäuren und Monocarbonsäuren zu erwarten.

Viele in der Natur vorkommende Alkohole sind Polyisoprenoide. Infolgedessen sind, wenn man mit der Verzweigung der Kohlenstoffkette rechnet, Methylverzweigungen in der den Polyisoprenoiden eigenen Anordnung am wahrscheinlichsten. Aus dem Derivat eines mehrfach ungesättigten Diterpenalkohols werden als Spaltprodukte die NABS-ester von geradkettigen und methylverzweigten ω-Hydroxysäure-methylestern von ω-Hydroxy-methylketonen, Dicarbonsäuren und Monocarbonsäuren — auch methylverzweigte —, Ketosäuren und Ketone entstehen (vergleiche untenstehendes Schema).



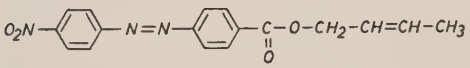
Schema der aus NABS-estern von Polyisoprenoiden — je nach der Lage von Doppelbindungen in der Kette — möglicherweise entstehenden Spaltstücke.

Für die vorliegende Arbeit ergibt sich nun eine Gliederung in die Herstellung der Modellsubstanzen, die Herstellung und Identifizierung möglicher Spaltprodukte, sowie die Durchführung der Spaltung von Mikromengen der Modellsubstanzen einschließlich der Trennung und Identifizierung der Spaltprodukte. Anschließend wird das Verfahren auf den NABS-ester eines — aus der von Gerock nachgewiesenen Lockstoffsäure erhaltenen — Alkohols und auf den NABS-ester des Lockstoffes angewandt

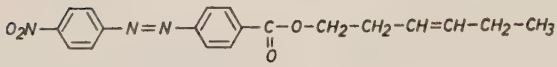
Die Modellsubstanzen

Die aufgeführten NABS-ester einfach und mehrfach ungesättigter geradkettiger primärer Alkohole (I—VI) werden hergestellt.

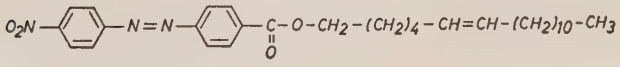
NABS-ester des



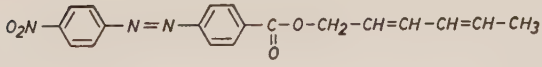
Crotonalkohol (I)



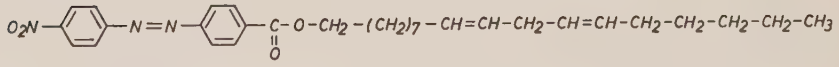
Hexen-(3)-ol-(1) (II)



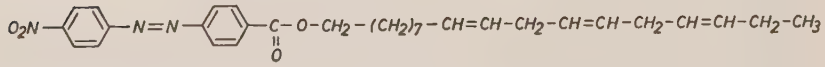
Petrosilinalkohol (III)



Sorbinol (IV)



Linolalkohol (V)



Linolenalkohol (VI)

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Crotonalkohols (I)

Der Crotonalkohol wird durch Reduktion reinen Crotonaldehydes mit Lithium-aluminium-hydrid gewonnen. Die Veresterung mit NABS-chlorid wird in Anlehnung an die von E. Hecker[15] angegebene Vorschrift ausgeführt, als Lösungsmittel wird aber an Stelle des Benzols getrocknetes Methylenchlorid verwandt. Das reine Derivat des Crotonalkohols kristallisiert aus Cyclohexan/Benzol und Aceton in roten Blättchen vom Schmelzpunkt 136° (Versuch 1).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Hexen-(3)-ol-(1) (II)

Das Hexen-(3)-ol-(1)* wird in üblicher Weise[15] in Benzol zu dem NABS-ester umgesetzt. Er kristallisiert aus Cyclohexan und Aceton in roten Blättchen vom Schmelzpunkt 129—130° (Versuch 2).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Petrosilinalkohols (III)

Zur Darstellung des Petrosilinalkohols wird die Petrosilinsäure in Anlehnung an eine Vorschrift von Bertram[20] aus Petersiliensamen isoliert. Dieser enthält als einzige ungesättigte Fettsäure die Petrosilinsäure ($\triangle^6$-Octadecen-carbonsäure-[1]). 74% der Fettsäuren sind Petrosilinsäure. Man extrahiert den gepulverten Samen mit Petroläther und erhält nach Abdestillieren des Lösungsmittels ein grünes Öl, das etwa ein Viertel des Samengewichtes ausmacht. Dieses wird mit alkoholischer Kalilauge verseift. Aus dem Verseifungsprodukt wird die Fettsäure isoliert, Ausbeute 10%. Die gesättigten Fettsäuren werden als unlöslicher Quecksilberkomplex abgetrennt. Nach Zerstörung des Quecksilberkomplexes der ungesättigten Fettsäuren kristallisieren diese in kleinen Blättchen. Die Reinigung der Petrosilinsäure von den geringen Mengen höher ungesättigter Fettsäuren gelingt durch vielfache Umkristallisation aus Aceton. Die reine Petrosilinsäure kristallisiert in kleinen, glänzenden Blättchen, die bei 31° schmelzen und bei 29° wieder erstarren (Versuch 3a).

Aus der Petrosilinsäure wird durch Reduktion mit Lithium-aluminium-hydrid der Petrosilinalkohol dargestellt, er destilliert bei Ölpumpenvakuum von 0,8 mm Hg bei 165° und kondensiert als glasklare, farblose Flüssigkeit (Versuch 3b).

* Das Präparat wurde uns freundlicherweise von der Firma Polack und Schwarz GmbH, Emmerich (Rhein), zur Verfügung gestellt.

Das Derivat des Petrosilinalkohols wird durch die übliche Umsetzung[15] mit dem NABS-chlorid erhalten. Die reine Verbindung kristallisiert aus Cyclohexan und aus Aceton in kleinen roten Blättchen, die bei 88—89° schmelzen (Versuch 3c).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Sorbinols (IV)

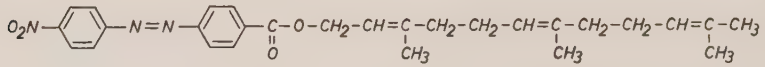
Bei der Darstellung des Derivates des Sorbinols wird in einer Reihe von Versuchen entsprechend der Vorschrift von E. Hecker[15] als Lösungsmittel absolutes Benzol verwandt, in einer Vergleichsreihe wasserfreies Methylenchlorid. Die Rohausbeuten sind nach der Umsetzung in Methylenchlorid höher, aber es werden nach der Umsetzung in Benzol höhere Ausbeuten an reiner Substanz erzielt (Versuch 4).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Linolalkohols (V) und des Linolenalkohols (VI)

Die reinen Alkohole werden nach der Vorschrift von E. Hecker[15] in wasserfreiem Benzol mit NABS-chlorid unter Zugabe von absolutem Pyridin umgesetzt. Beide Derivate kristallisieren aus Benzol in feinen roten Blättchen. Das Derivat des Linolalkohols hat einen Schmelzpunkt von 79—80°, der Schmelzpunkt des Derivates des Linolenalkohols liegt bei 74—75°. Der intensive Geruch beider Derivate nach Leinöl verschwand erst nach vielfacher Umkristallisation aus verschiedenen Lösungsmitteln. Die analysenreinen Präparate sind geruchsfrei. Nach zwei Wochen verkleben die Kristalle wieder miteinander, und es stellt sich der charakteristische Geruch nach Leinöl wieder ein. Man kann dieses Verhalten auf die leichte Autoxydierbarkeit dieser Verbindungen zurückführen (Versuche 5 und 6).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Farnesols (VII)

Als Modellsubstanz für einen mehrfach ungesättigten primären Alkohol mit Methylverzweigungen vom Typ der Polyisoprenoide dient das Derivat des Farnesols*.



NABS-ester des Farnesols (VII)

* Herrn Dr. rer. nat. R. Beckmann sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung dieses Präparates gedankt.

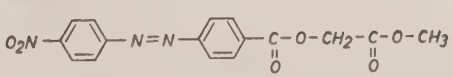
Die Spaltprodukte

Nach den Voraussetzungen des Arbeitsplanes sind bei der oxydativen Spaltung als Spaltprodukte die NABS-ester von geradkettigen und methylverzweigten ω-Hydroxysäure-methylestern, die Derivate von ω-Hydroxy-methylketonen, geradkettige und methylverzweigte Di- und Monocarbonsäuren, Ketosäuren und Ketone zu erwarten. Von jeder Verbindungsklasse werden alle Spaltprodukte mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen beschafft oder hergestellt, um ihr chemisches Verhalten zu studieren, geeignete papierchromatographische Systeme zu erproben oder neue zu ermitteln und entsprechende Trennungsgänge auszuarbeiten. Es wird zunächst darauf verzichtet, die große Zahl der möglichen Spaltprodukte mit mehr als sechs Kohlenstoffatomen in die Betrachtung einzuschließen. Sollten solche auftreten, so wird man aus einer ersten oxydativen Spaltung und dem anschließenden Trennungsgang eine Reihe von Anhaltspunkten gewinnen, nach denen man leicht eine kleinere Auswahl noch fehlender Referenzsubstanzen herstellen kann, um sie bei einer zweiten Spaltung zur Verfügung zu haben.

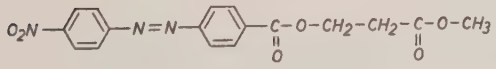
1. Die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester geradkettiger ω-Hydroxy-fettsäure-methylester

Die folgenden Derivate werden als Referenzsubstanzen verwandt.

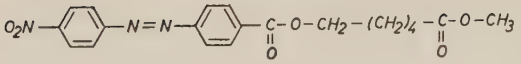
NABS-ester von



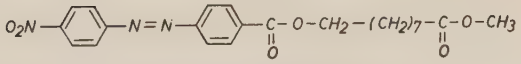
Glykolsäure-methylester (VIII)



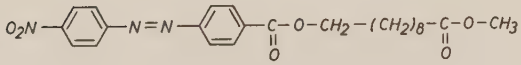
β-Hydroxy-propionsäure-methylester (IX)



ε-Hydroxy-capronsäure-methylester (X)



ω-Hydroxy-nonansäure-methylester (XI)



ω-Hydroxy-decansäure-methylester (XII)

Da die NABS-ester der freien ω-Hydroxycarbonsäuren, die bei der Spaltung entstehen, unbeständig sind[19], werden sie im Laufe des Trennungsganges mit Diazomethan zu den entsprechenden Methylestern umgesetzt. Diese werden dann aus dem Spaltungsansatz isoliert. Daher müssen sie als Referenzsubstanzen dargestellt werden.

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Glykolsäure-methylesters (VIII)

Der Glykolsäure-methylester wird nach der Vorschrift von E. Hecker mit NABS-chlorid unter Zugabe von wasserfreiem Pyridin in Methylenchlorid umgesetzt. Das Derivat kristallisiert aus Benzol/Cyclohexan in dunkelroten Prismen mit einem Schmelzpunkt von 148° (Versuch 7).

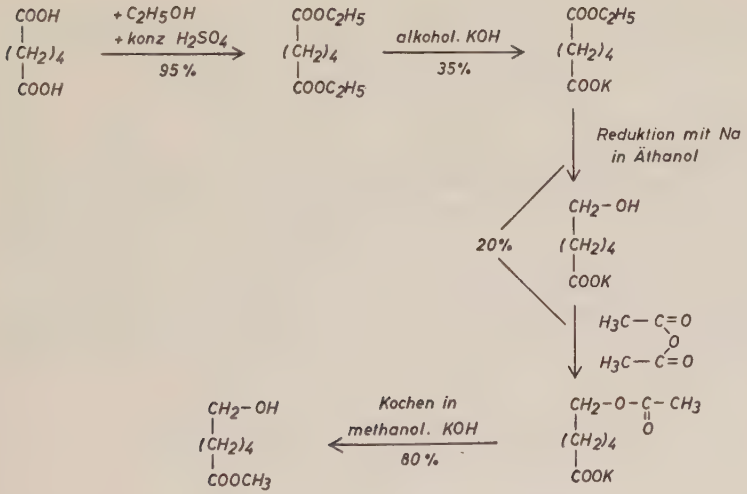
Die chromatographische Reinigung dieses Derivates muß, da die Verbindung wesentlich instabiler als die Derivate von Alkoholen ist, auf saurem Aluminiumoxyd der Aktivität IV erfolgen.

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des β-Hydroxy-propionsäure-methylester (IX)

Die β-Hydroxy-propionsäure wird durch Verseifung von Äthylencyanhydrin hergestellt[21]. Sie enthält noch 20% nicht entfernbares Wasser und wird darum mit Diazomethan verestert und anschließend destilliert. Der wasserfreie β-Hydroxy-propionsäure-methylester wird in derselben Weise wie der Glykolsäure-methylester mit NABS-chlorid umgesetzt. Das Derivat kristallisiert in kleinen rechteckigen Blättchen vom Schmelzpunkt 147—148° (Versuch 8).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des ε-Hydroxy-capronsäure-methylesters (X)

Bei der Darstellung der ε-Amino-capronsäure kann man nicht von der käuflichen ε-Amino-capronsäure ausgehen, weil bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf das Hydrochlorid ein Gemisch von ε-, δ-Hexensäure und kleinen Mengen ε- und δ-Hydroxysäure entstehen.



Die ε-Hydroxy-capronsäure wird darum in Analogie zur Darstellung der ω-Hydroxy-caprinsäure aus der Sebacinsäure[23] auf dem im Formelschema angegebenen Wege hergestellt. Aus dem Methylester der ε-Hydroxy-capronsäure wird der NABS-ester auf dem üblichen Wege erhalten, er kristallisiert in rubinroten Prismen vom Schmelzpunkt 123—124° (Versuch 9).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des ω-Hydroxy-nonansäure-methylesters (XI)

Diese Verbindung wird durch oxydative Spaltung des analysenreinen Derivates des Linolalkohols und des Linolenalkohols erhalten (siehe Seite 39). Ihr Schmelzpunkt und ihr Mischschmelzpunkt sind mit einem analysenreinen Präparat von H. Zayed identisch.

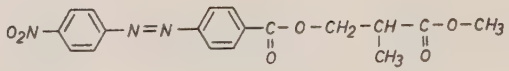
4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des ω-Hydroxy-decansäure-methylesters (XII)

Dieses Derivat wurde bereits von A. Butenandt und H. Rembold[24] im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung der ω-Hydroxy-$\triangle^2$-decensäure aus dem Weiselfuttersaft der Bienen auf Grund der Erfahrungen mit dem Derivat des Glykolsäure-methylesters dargestellt. Das analysenreine Präparat dient hier als Referenzsubstanz.

2. Die 4'Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester methylverzweigter ω-Hydroxy-fettsäure-methylester

Um das papierchromatographische Verhalten der Derivate geradkettiger und methylverzweigter ω-Hydroxy-fettsäure-methylester vergleichen zu können, wird das Derivat des α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylesters dargestellt, das nach den oben gemachten Voraussetzungen auch als Spaltprodukt auftreten kann (siehe Seite 12).

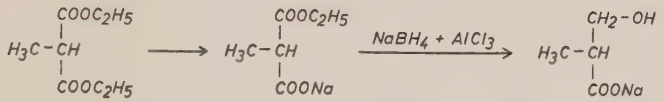
4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylesters (XIII)



(XIII)

Weder die α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure, noch ihr Methylester sind in der Literatur beschrieben. Da die Darstellung von ω-Hydroxysäuren durch Reduktion der Kaliumsalze der Dicarbonsäurehalbester nach Bouveault-Blanc sehr mühsam ist, wie sich bei der Herstellung des ε-Hydroxy-capronsäure-methylesters zeigt, erscheint es reizvoll, ein neues Verfahren anzuwenden. H. C. Brown und C. B. Subba Rao[25] können mit Natriumborhydrid unter Zugabe von Aluminiumchlorid in Diäthylenglykol-dimethyläther als Lösungsmittel Ester, Lactone und freie Carbonsäuren zu den entsprechenden Alkoholen reduzieren, während die Natriumsalze von Carboxylgruppen nicht reduziert werden. Ausgehend von dem Diäthylester der Methylmalonsäure[26] wird das Natriumsalz des Halbesters in Analogie zu der Vorschrift von F. Margnoy[27] dargestellt und dieses Salz in Diäthylenglykol-dimethyläther, in dem bereits das Natriumborhydrid gelöst ist, suspendiert,

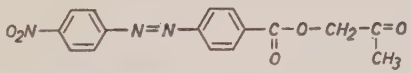
wobei sich nur 1g davon in 600 ccm Lösungsmittel löst. Die Reaktion wird bei völligem Feuchtigkeitsausschluß durch die Zugabe des Aluminiumchlorids in Diglyme gesteuert. Die erhaltene α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure wird sogleich mit Diazomethan verestert und der Methylester in der üblichen Weise mit NABS-chlorid umgesetzt. Die Verbindung kristallisiert aus Cyclohexan/Benzol-Gemischen in roten, glänzenden Blättchen mit einem Schmelzpunkt von 146° (Versuch 10).



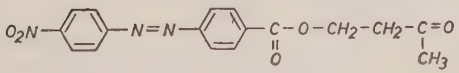
3. Die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester der ω-Hydroxy-methylketone

Nach den Voraussetzungen für diese Arbeit sind bei der Spaltung der NABS-ester von isoprenoiden Alkoholen die folgenden Verbindungen zu erwarten:

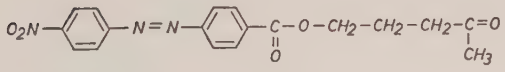
NABS-ester von



Hydroxyaceton (XIV)



Butanol-(1)-on-(3) (XV)



Pentanol-(1)-on-(4) (XVI)

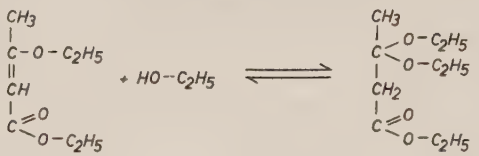
4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Hydroxyacetons (XIV)

Das Hydroxyaceton[28] wird in üblicher Weise mit dem NABS-chlorid umgesetzt. Dabei fällt die schlechte Löslichkeit des sich bildenden Deri-

vates in Benzol auf, da die Derivate der Alkohole und der ω-Hydroxyfettsäure-methylester sich sehr gut darin lösen. Bei der chromatographischen Reinigung des Derivates des Hydroxyacetons sind deswegen zum Eluieren große Mengen von Benzol nötig. Auch die Umkristallisation erfolgt zunächst aus Benzol und dann aus Aceton. Das Präparat kristallisiert in roten Plättchen mit dem Schmelzpunkt 166° (Versuch 11).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Butanol-(1)-on-(3) (XV)

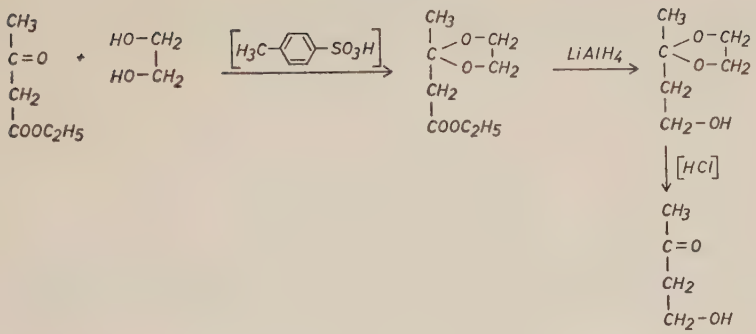
Es war zunächst daran gedacht, das Butanol-(1)-on-(3) durch Reduktion des Acetessigester-diäthylacetals mit Lithium-aluminium-hydrid herzustellen. Da aber F. Arndt, L. Loewe und M. Ozansoy[29] zeigen konnten, daß sich ein Gleichgewicht zwischen dem Enoläther und dem Diäthylacetal einstellt, hätte man aus der Reduktion ein Gemisch, aber kein einheitliches Produkt erhalten.



Es wird darum aus Acetessigester, Äthylenglykol und p-Toluolsulfonsäure als Katalysator das ringförmige Acetal nach den Angaben von E. J. Salmi[30] hergestellt. Dieses Acetessigester-äthylenketal wird mit Lithium-aluminium-hydrid[31] reduziert. Die Zerstörung des Lithium-alanat-Komplexes erfolgt, um die Ketalspaltung zu vermeiden, nicht mit verdünnter Schwefelsäure, sondern nach den Angaben von W. G. Brown[32] im leicht alkalischen Milieu mit Natrium-kalium-tartrat. Das Butanol-(4)-äthylenketal-(2) wird durch Destillation gereinigt (Sdp. $_{9\ \mathrm{Torr}}$ 82—85°). Die Ketalspaltung erfolgt unter der katalytischen Wirkung von Salzsäure nach den Angaben von H. Willimann und H. Schinz[33]. Das Rohprodukt wird anschließend destilliert (Sdp.$_{1\ \mathrm{Torr}}$ 60—62,5°) und das Destillat in der üblichen Weise mit NABS-chlorid in Benzol umgesetzt. Die Umkristallisation erfolgt aus Benzol und Aceton, es werden rote Plättchen mit einem Schmelzpunkt von 145° erhalten (Versuch 12).

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des Pentanol-(1)-on-(4) (XVI)

Das Pentanol-(1)-on-(4) wird nach N. D. Zelinsky und E. F. Dengin[34] durch eine Acetessigester-Synthese aus Natriumacetessigester und



Äthylendibromid mit anschließender Ketospaltung hergestellt, wobei gleichzeitig die primäre Hydroxylgruppe durch saure Verseifung des endständigen Broms eingeführt wird. Es hätte nahe gelegen, die Verbindung durch Reduktion des Ketals des Lävulinsäureäthylesters mit Lithium-aluminium-hydrid darzustellen, doch ergab das Literaturstudium, daß dabei die Isolierung des Endproduktes große Schwierigkeiten bereitet.

Die Herstellung des NABS-esters des Pentanol-(1)-on-(4) erfolgt in üblicher Weise. Nach der Umkristallisation aus Benzol/Cyclohexan und Wasser/Aceton kristallisiert das Derivat in roten Plättchen mit einem Schmelzpunkt von 120,5 bis 121,5° (Versuch 13).

Durch die Darstellung der NABS-ester dieser drei ω-Hydroxymethylketone ist gezeigt, daß sich deren NABS-ester in Ausbeuten zwischen 65 und 76 Prozent herstellen lassen. Die Derivate kristallisieren leicht, schmelzen scharf und sind infolgedessen gut zur Charakterisierung von Hydroxyketonen geeignet.

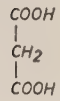
4. Die Dicarbonsäuren

Bei Zugrundelegung der Annahmen des Arbeitsplanes können die folgenden Dicarbonsäuren entstehen, wobei nur solche mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen berücksichtigt sind.

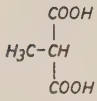
Von diesen werden nach Literaturvorschriften die Methylmalonsäure (XXII)[35] aus ihrem Diäthylester, die Methylbernsteinsäure[36] (XXIV) und die β-Methyl-glutarsäure[37] (XXVII) hergestellt.

Die Malonsäure konnte von einigen Untersuchern[38, 39, 40] nach der oxydativen Spaltung mit Permanganat in Aceton nicht nachgewiesen

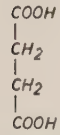
Oxalsäure (XX)



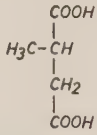
Malonsäure (XXI)



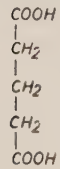
Methyl-malonsäure (XXII)



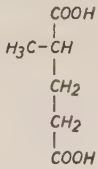
Bernsteinsäure (XXIII)



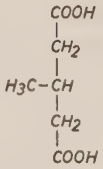
α-Methyl-bernsteinsäure (XXIV)



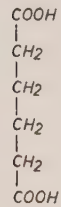
Glutarsäure (XXV)



α-Methyl-glutarsäure (XXVI)



β-Methyl-glutarsäure (XXVII)



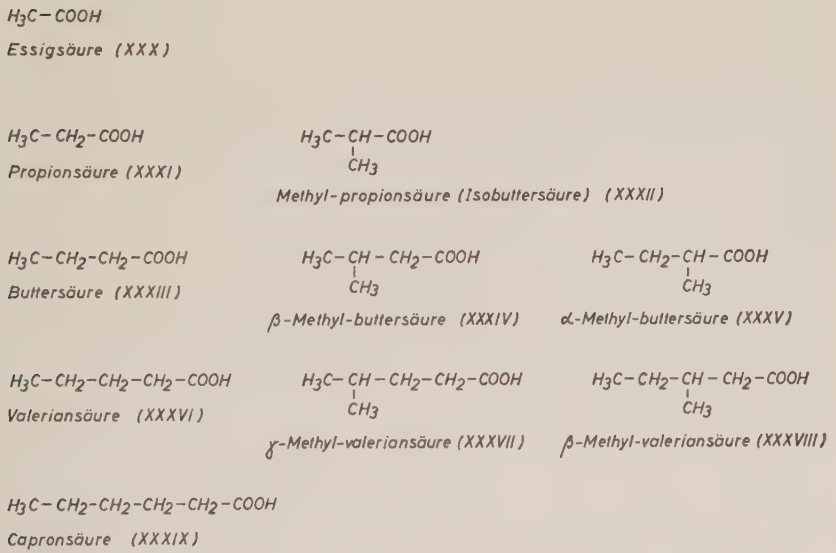
Adipinsäure (XXVIII)

werden. Bei der Durchsicht der Originalarbeiten läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen, ob die Spaltung in wasserfreiem Aceton vorgenommen wurde. Nach der Spaltung des NABS-esters des Linolenalkohols mit Kaliumpermanganat in wasserfreiem Aceton ist Malonsäure nachzuweisen (siehe Seite 39 und Abbildung 10). A. T. James und J. Webb[41] haben mit denselben Konzentrationen Permanganat wie in den hier geschilderten Versuchen Arachidonsäure gespalten, wobei sie als Lösungsmittel Eisessig nahmen, höher erhitzten und bei der Aufarbeitung mit 5 n Schwefelsäure versetzten. Auch sie konnten aus

den Spaltungsansätzen Malonsäure isolieren. Es hängt demnach von der Wahl der Versuchsbedingungen ab, ob es gelingt, die Malonsäure nachzuweisen.

5. Die Monocarbonsäuren

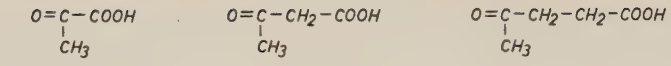
Nach den Voraussetzungen des Arbeitsplans ist mit den unten aufgeführten geradkettigen und methylverzweigten Monocarbonsäuren mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen zu rechnen:



Von diesen werden die nicht im Handel erhältlichen α-Methyl-buttersäure[44] (XXXV) und β-Methyl-valeriansäure[45] (XXXVIII) dargestellt.

6. Die Ketosäuren

Aus der oxydativen Spaltung sind als primäre Spaltprodukte die folgenden Ketosäuren zu erwarten:

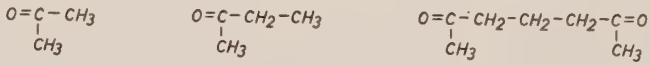


Brenztraubensäure (XL) | Acetessigsäure (XLI) | Lävulinsäure (XLII)

Von diesen ist aus den Spaltungsansätzen nur die Brenztraubensäure zu isolieren. Die unbeständige Acetessigsäure wird schon während der Spaltung zerstört. Die Lävulinsäure konnte bisher nach der oxydativen Spaltung von Farnesol mit Kalium-permanganat in Aceton nicht isoliert werden[58].

7. Die Ketone

Man kann neben Aceton, Methyl-äthyl-keton auch noch Heptan-2.6.-dion[46] (LII) erwarten, dessen 2.4-Dinitro-phenyl-hydrazon nicht in der Literatur beschrieben ist. Es wird darum dargestellt, nach mehrfacher Umkristallisation aus Chloroform und Glykol-monomethyläther kristallisiert es in gelben Nadeln und hat einen Schmelzpunkt von 185° (Versuch 14).



Aceton (L) | Methyl-äthyl-keton (LI) | Heptan-2,6-dion (LII)

Die Identifizierung der Spaltprodukte

Das am besten geeignete Verfahren für die Identifizierung kleinster Substanzmengen, wie man sie nach der Spaltung von 1 mg der Modellsubstanzen erwartet, ist die Papierchromatographie, wenn entsprechende Referenzsubstanzen zur Verfügung stehen. Diese sind in dem vorausgegangenen Abschnitt besprochen.

1. Identifizierung der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

Die 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester sind in Wasser unlöslich und wenig polar. Infolgedessen macht es besondere Schwierigkeiten, ein System zu finden, in dem man Substanzen mit gleichen funktionellen Gruppen und Molekulargewichten von 350 bis 500, die sich

Tabelle 1

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des	R_M-Wert
Hydroxyaceton (XIV)	0,52
Butanol-(1)-on-(3) (XV)	0,57
Pentanol-(1)-on-(4) (XVI)	0,62
Glykolsäure-methylester (VIII)	0,65
β-Hydroxy-propionsäure-methylester (IX)	0,74
β-Hydroxy-α-methyl-propionsäure-methylester (XIII)	0,81
Isobuttersäure (XXXII)	0,97
Methylalkohol	1,00
ω-Hydroxy-nonansäure-methylester (XI)	1,14
ω-Hydroxy-dekansäure-methylester (XII)	1,28

R_M-Werte einiger 4'Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester
System: n-Dekan (3) und Pyridin (2)

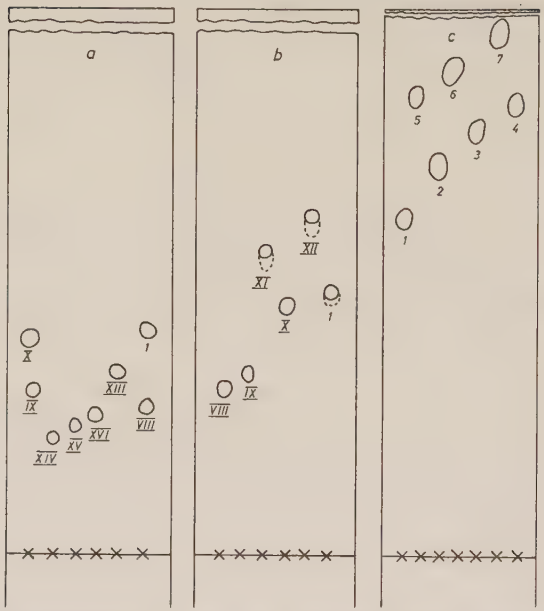


Abb. 1. Papierchromatogramm zur Identifizierung der NABS-ester von ω-Hydroxysäure-methylestern (a und b), von ω-Hydroxy-methylketonen (a) und von niederen Alkoholen (c) (Versuch 15). System: n-Dekan (3) und Pyridin (2).

Anmerkung: Die römischen und arabischen Zahlen bezeichnen die Referenzsubstanzen, die am Ende der Arbeit auf einer herausklappbaren Tafel zusammengestellt sind.

nur um eine CH_2-Gruppe unterscheiden, sicher identifizieren kann. Am besten geeignet erweist sich ein homogenes System aus n-Dekan (3) und Pyridin (2), mit dem man auf acetyliertem Papier Schleicher und Schüll 2043 b aufsteigend chromatographiert (Abb. 1). Die systematischen Versuche zur Entwicklung dieses Systems sind in der Diplomarbeit[19] dargestellt. Man erzielt die besten Trennungen, wenn man den Trocknungsgrad des Papiers normiert. Da man die Front nicht immer hinreichend genau festlegen kann, werden die Laufstrecken auf die des NABS-esters des Methylalkohols bezogen und mit R_M bezeichnet (Versuch 15).

Methylverzweigungen sind von geringem Einfluß auf den R_M-Wert, ebenso ein Mehrgehalt von einer CH_2-Gruppe (Tabelle 1).

Tabelle 2

4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des	R_M-Wert
Methylalkohol	1,00
Äthanol	1,16
Propanol	1,25
Butanol	1,33
Pentanol	1,37
Hexanol	1,45
Octanol	1,56

R_M-Werte der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester einiger primärer aliphatischer Alkohole. System: n-Dekan (3) und Pyridin (2)

2. Identifizierung der Monocarbonsäuren

Die als Spaltprodukte zu erwartenden Monocarbonsäuren lassen sich in drei Gruppen einteilen: In die niederen geradkettigen Monocarbonsäuren mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen, die methylverzweigten mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen und in die geradkettigen von sechs bis zweiundzwanzig Kohlenstoffatomen. Alle drei Gruppen der Monocarbonsäuren werden papierchromatographisch als Hydroxamsäuren[47], die beim Besprühen mit Eisen III-chlorid dunkelviolette, lange Zeit beständige Komplexe bilden, in verschiedenen Systemen getrennt. Die Hydroxamsäuren können nach Veresterung der freien Fettsäuren mit Diazomethan durch Umsetzung mit einem Hydroxylaminreagenz in guter Ausbeute hergestellt werden (Versuch 16).

a. Geradkettige Fettsäuren (Ameisensäure bis Caprylsäure)

Am besten geeignet erweist sich das von A. Thompson[48] beschriebene System aus Amylalkohol (40), Eisessig (10) und Wasser (50), in dem man die Hydroxamsäure auf Schleicher und Schüll Papier 2043b durch aufsteigendes Entwickeln mit der Oberphase gut trennt.

b. Methylverzweigte Monocarbonsäuren mit bis zu sechs Kohlenstoffatomen

Nach den umfangreichen Untersuchungen von H. Kalbe[49] ist die Trennung der Salze methylverzweigter isomerer Monocarbonsäuren nicht möglich. Es muß ein besonderes System für deren Trennung entwickelt werden:

Die Hydroxamate der methylverzweigten isomeren Monocarbonsäuren lassen sich in dem System n-Octylalkohol (75), Wasser (75), Ameisensäure (25) und n-Heptan (5) auf Schleicher und Schüll Papier 2043b gut trennen, wenn man das Papier vorher 8 Stunden bei Raum-

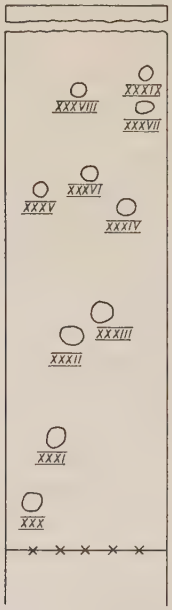


Abb. 2. Papierchromatogramme zur Identifizierung der methylverzweigten Monocarbonsäuren (Versuch 17), siehe Anmerkung Abb. 1. System: n-Octylalkohol p. a. (75), Wasser (75), n-Heptan (5) und Ameisensäure (25); man entwickelt mit der organischen Oberphase.

temperatur in der Horizontalkammer nach Strobel und Grassmann[50] mit Wasserdampf sättigt und dann 30 bis 40 Stunden mit der organischen Phase entwickelt (Abb. 2 und Tabelle 3). Der Heptan-Zusatz soll den hoch viskosen Octylalkohol beweglicher machen, die Ameisensäure die Dissoziation der Hydroxamate weitgehend verhindern. Bei aufsteigendem Entwickeln kann wegen der geringen Steighöhe des Octylalkohols keine Trennung erzielt werden. Während des Chromatographierens ist Temperaturkonstanz zu wahren und die Horizontalkammer selbst vor geringer Zugluft durch einen mit Stanniol bezogenen Holzkasten zu schützen (Versuch 17).

c. Höhere Fettsäuren mit bis zu 22 Kohlenstoffatomen

Das brauchbarste Verfahren wird in Anlehnung an die Angaben von Micheel und Schweppe[51] so abgeändert, daß man auch das käufliche acetylierte Papier von Schleicher und Schüll 2043b verwenden kann, indem man Eisessig zusetzt. Es hat dann die Zusammensetzung Essig-

Tabelle 3

Hydroxamsäure der	R_f-Wert
Essigsäure (XXX)	0,09
Propionsäure (XXXI)	0,22
Isobuttersäure (XXXII)	0,43
Buttersäure (XXXIII)	0,48
β-Methyl-buttersäure (XXXIV)	0,71
α-Methyl-buttersäure (XXXV)	0,68
Valeriansäure (XXXVI)	0,75
γ-Methyl-valeriansäure (XXXVII)	0,88
β-Methyl-valeriansäure (XXXVIII)	0,92
Capronsäure (XXXIX)	0,94

R_f-Werte der methylverzweigten Monocarbonsäuren. System: n-Oxylalkohol p. a. (75), Wasser (75), n-Heptan (5) und Ameisensäure (25); man entwickelt mit der organischen Oberphase.

säureäthylester (12), Tetrahydrofuran (70), Wasser (94), Eisessig (9) (Versuch 18).

3. Identifizierung der Dicarbonsäuren

Von den in der Literatur angebenen Systemen war keines für die Auftrennung aller Dicarbonsäuren von der Oxalsäure bis zur Sebacinsäure geeignet. Für die Identifizierung der Oxalsäure und der Malonsäure wird das von F. A. Isherwood[52] angegebene System aus Propanol (60) und konzentriertem Ammoniak (40), mit dem man auf Whatmann Papier Nr. 1 absteigend entwickelt, benutzt. Die Dicarbonsäuren von der Bernsteinsäure bis zur Sebacinsäure lassen sich am besten in dem von A. G. Long und Mitarbeitern[53] angegebenen System aus Äthanol (80) und 16proz. wässrigem Äthylamin (20) auftrennen. Die Flecken werden mit dem Sprühreagenz von Schweppe nachgewiesen (Versuch 19a und 19b).

4. Identifizierung der Ketosäuren und Ketone

Die Ketosäuren und Ketone werden aus dem Spaltungsansatz als 2.4-Dinitrophenylhydrazone isoliert. Für die Identifizierung dieser Derivate sind eine Reihe von papierchromatographischen Systemen beschrieben worden[55]. Da nach der oxydativen Spaltung des NABS-Derivates vom Lockstoff und vom Alkohol aus der Säurefraktion keine entsprechenden Spaltprodukte isoliert wurden, wird hier auf die eingehende Darstellung dieser Methode verzichtet.

Mikromethode zur oxydativen Spaltung ungesättigter 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

Das Molekül eines ungesättigten NABS-esters enthält neben den olefinischen Doppelbindungen, die oxydativ gespalten werden sollen, noch die leicht verseifbare Esterbindung. Diese soll bei der oxydativen Spaltung erhalten bleiben, weil dann ein Spaltprodukt markiert ist und damit die Stellung der Hydroxylgruppe angezeigt wird. Die Bedingungen der Spaltung müssen außerdem so gewählt werden, daß keine Verschiebungen der olefinischen Doppelbindungen eintreten. In der Diplomarbeit[19] wurde ausführlich diskutiert, warum die Spaltung mit Kaliumpermanganat in Aceton das am besten geeignete Verfahren ist. Nach der dort beschriebenen Methode können bei oxydativer Spaltung von 2 mg des NABS-Derivates eines einfach ungesättigten Alkohols die Spaltprodukte in Mengen isoliert werden, die für eine Identifizierung ausreichen. Der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-Rest wird dabei nicht verändert.

Um den Substanzbedarf bei der Spaltung auf weniger als 2 mg zu reduzieren, war es angezeigt, jeden Verlust durch Benetzung und durch Verdampfen zu vermeiden. Dies gelingt am besten, wenn man alle Arbeitsgänge in einer Hochvakuumanlage ausführt. Solche Apparaturen sind bei Arbeiten mit radioaktivem Kohlenstoff gebräuchlich. Nach den Angaben von M. Calvin[56] wird eine solche Apparatur aufgebaut und für die besonderen Aufgaben entsprechend abgeändert oder ergänzt. Alle die Wände benetzenden Substanzen können in kurzer Zeit in dem kältesten Gefäß gesammelt werden. Um sekundäre Veränderungen der Spaltprodukte zu vermeiden, wird der Trennungsgang so schonend wie möglich durchgeführt. Alle für den Umgang mit Mikro-

mengen notwendigen Vorsichtmaßregeln[57] werden beachtet und geeignete Glasgeräte entwickelt oder bereits bekannte modifiziert (Abb. 3).

Die Bedingungen der oxydativen Spaltung und jedes einzelnen Reaktionsschrittes bis zur Identifizierung der Spaltprodukte werden mit immer kleineren Mengen geeigneter Modellsubstanzen erprobt und solange modifiziert, bis die Ausbeuten bei jedem Schritt mindestens 80% betragen. Die Schilderung und Diskussion der großen Zahl von Modellversuchen würde zu viel Raum beanspruchen. In die folgende Beschreibung werden darum nur die Versuche aufgenommen, die für die oxydative Spaltung des NABS-Derivates vom Lockstoff notwendig sind (Versuch 20). Das gesamte Verfahren, einschließlich der Isolierung ist in einem herausklappbaren Schema am Ende der Arbeit zusammengefaßt; außerdem sind in den Abbildungen 5—10 die verwandten Apparaturen wiedergegeben.

1. Die Spaltung

Die oxydative Spaltung mit Permanganat muß in völlig wasserfreiem Aceton durchgeführt werden. Während der ganzen Reaktion darf keine Feuchtigkeit in die Apparatur gelangen, denn Spuren von Wasser schaffen mit den Kaliumionen des Permanganats ein alkalisches Milieu, in dem die von der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4) ausgehende Esterbindung sofort gespalten wird. Die oxydative Spaltung wird darum in einem Zentrifugenglas (Abb. 3 [1]) ausgeführt, das mit einem Kühlfinger als Rückflußkühler [2] versehen ist, dessen Öffnung man mit einem Calciumchlorid-Rohr [3] verschließt. Ein gleichmäßiges Sieden des Reaktionsgemisches läßt sich bei den großen Mengen von Braunstein, die aus den 100 mg Permanganat entstehen, nur erreichen, wenn man die Apparatur in ein Glycerinbad von 65° einstellt und ein Siedestäbchen [4] zugibt (siehe Abb. 4)*. Um das Verdampfen von Spaltprodukten mit dem Aceton beim Öffnen der Apparatur zu vermeiden, wird diese vor jedem Eintragen weiteren Permanganats eine Weile in einer Kältemischung aus Aceton/Trockeneis gekühlt. Da bei der Spaltung auf einen Teil Modellsubstanz hundert Teile Kaliumpermanganat eingesetzt werden müssen, ist die Isolierung der Spaltprodukte schwierig. Verringert man aber die Permanganat-Menge, so werden die Ausbeuten wesentlich schlechter. Am Ende der Spaltung sind

* Die Abb. 4—8 sind auf dem herausklappbaren Schema am Ende der Arbeit.

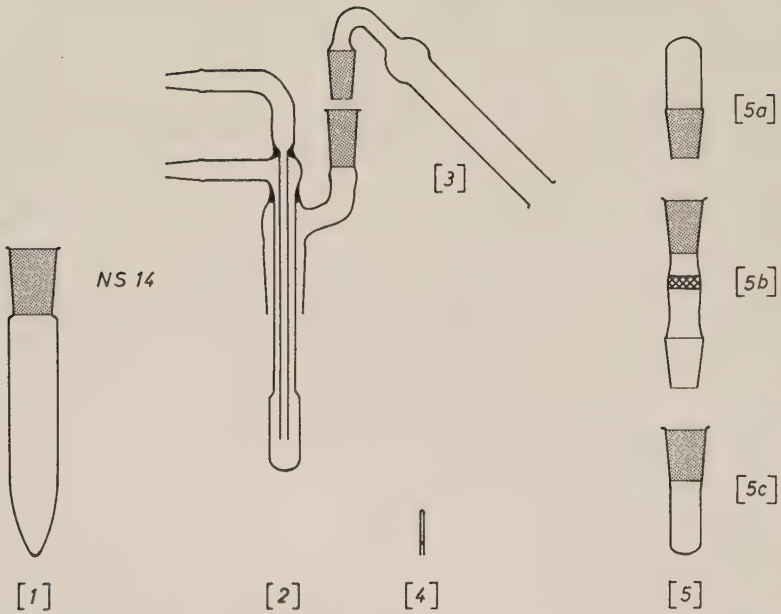


Abb. 3. Die Mikrogeräte: [1] Zentrifugenglas, [2] Kühlfinger, [3] $CaCl_2$-Rohr, [4] Siedestab und [5] Gerät zur Filtration von viskosen Flüssigkeiten durch Zentrifugieren.

in dem Reaktionsgemisch neben den Spaltprodukten viel Braunstein und Kaliumpermanganat enthalten; die Säuren liegen als Kaliumsalze vor.

2. Abdestillieren des Lösungsmittels und der Ketone, Zerstörung des überflüssigen Permanganats

Nach der Spaltung wird die geschlossene Apparatur mit Aceton/Trockeneis gekühlt, dann geöffnet und das kalte Zentrifugenglas an die Hochvakuumapparatur angeschlossen (siehe Abb. 5), wo zunächst das Aceton bei 2×10^{-1} Torr unter Außenkühlung beginnend in eine Spiralfalle in Trockeneis/Aceton abdestilliert. Schließlich werden bei Zimmertemperatur und 3×10^{-3} Torr die möglicherweise entstandenen Ketone in eine weitere Spiralfalle destilliert. Danach ist der Rückstand im Zentrifugenglas völlig trocken.

Mit der Zugabe von Wasser muß das vorhandene Alkali neutralisiert und gleichzeitig das nicht verbrauchte Kaliumpermanganat zerstört werden. Das Milieu darf nicht mineralsauer werden, weil das Permanganat sonst möglicherweise entstandene Oxalsäure zerstört. Somit ist die Zerstörung des Kaliumpermanganats mit Schwefeldioxyd in schwefelsaurer Lösung nicht sinnvoll, außerdem müßte man dann die Spaltprodukte aus einer großen Menge von Mangansalzen und Sulfiten isolieren. Dazu stören die Sulfite die weitere Abtrennung der Monocarbonsäuren. Nach umfangreichen qualitativen und quantitativen Bestimmungen, ist die Zugabe einer wässrigen Lösung von Ameisensäure das Verfahren der Wahl. Die Ameisensäure verbraucht sehr schnell, solange das alkalische Milieu besteht, das überschüssige Permanganat nach der untenstehenden Gleichung, gleichzeitig wird neutralisiert. Das nur kurze Zeit bestehende alkalische Milieu bewirkt keine Spaltung der NABS-ester (Abb. 6).

$$2\,KMnO_4 + HCOOK \rightarrow 2\,K_2CO_3 + H_2O + 2\,MnO_2$$

Alle hierbei hinzugefügten Salze können im Laufe des Trennungsganges wieder leicht entfernt werden. Durch die Zugabe von Kaliumbicarbonat werden gleichzeitig die überschüssige Ameisensäure und alle als freie Säuren vorliegenden Spaltprodukte neutralisiert.

3. Extraktion der Fettsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren

Alle Säuren, außer den NABS-ester-Bruchstücken, liegen nunmehr in Lösung vor. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand, der Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren enthält, abpipettiert und der im wesentlichen aus Braunstein und NABS-ester-Bruchstücken bestehende Rückstand noch zweimal mit einer Kaliumbicarbonat-Lösung extrahiert.

4. Isolierung des NABS-ester-Bruchstückes

Die Abtrennung der in Wasser unlöslichen Derivatbruchstücke von den großen Mengen Braunsteins erfolgt in saurer Lösung durch Einleiten von Schwefeldioxyd (siehe Abb. 7). Die Derivatbruchstücke fallen als feinflockiger, roter Niederschlag aus, den man durch Zentrifugieren abtrennen kann. Er wird anschließend durch Lyophilisieren getrocknet.

5. Veresterung der NABS-ester-Bruchstücke mit Diazomethan

Nachdem sich bereits bei der Diplomarbeit gezeigt hatte, daß die Derivate der freien ω-Hydroxysäuren unstabil und schwer zu hand-

haben sind, hingegen die beständigeren Methylester leicht gereinigt werden können, werden die getrockneten Derivatbruchstücke in Methylenchlorid suspendiert und mit einer Lösung von Diazomethan in Methylenchlorid verestert, wobei die Methylester in Lösung gehen. Die Abtrennung der Polymerisationsprodukte des Diazomethans und anderer Verunreinigungen erfolgt ebenso wie die Zerstörung des überschüssigen Reagenzes bei der Chromatographie auf einer Säule mit saurem Aluminiumoxyd der Aktivität III.

6. Die chromatographische Identifizierung des NABS-ester-Bruchstückes

Sie erfolgt in der auf Seite 27 f. beschriebenen Weise.

7. Prüfung auf Ketosäuren

Ein Fünftel des Kaliumbicarbonat-Extraktes wird lyophilisiert und durch Zugabe des 2.4-Dinitro-phenylhydrazin-Reagenzes auf Ketosäuren geprüft. Bei negativem Ausfall der Testreaktionen wird der Trennungsgang in der hier beschriebenen Weise fortgeführt. Fällt die Probe positiv aus, so ist es sinnvoll, den ganzen Ansatz zur Identifizierung der Ketosäuren aufzuarbeiten. Bei den gespaltenen Modellsubstanzen, ferner bei der Spaltung des Alkohol-Derivates aus der Lockstoffsäure und des Lockstoffderivates werden keine Ketosäuren nachgewiesen.

8. Abtrennung der Monocarbonsäuren von den Dicarbonsäuren

Das am besten geeignete Verfahren ist nach den durchgeführten Untersuchungen die Wasserdampfdestillation. Bei höheren Fettsäuren mit mehr als acht Kohlenstoffatomen muß man damit rechnen, daß sie sich an den kühlen Stellen der Apparatur kondensieren und dann nicht quantitativ im Destillat erscheinen. Es wird darum die Apparatur von R. Markham[42] zur Wasserdampfdestillation von Mikromengen modifiziert (Abb. 8 und 9), bei der alle Teile zwischen Destillierkolben und Kondensationsstelle von einem Dampfmantel umhüllt werden; die durch einen Glasstopfen verschlossene Öffnung gestattet das Herunterspülen von Kondensaten aus dem Kühler mit Äther. Auf diese Weise lassen sich alle Monocarbonsäuren bis zur Palmitinsäure aus dem mit 1n Schwefelsäure angesäuertem Gemisch durch Einblasen von Wasserdampf quantitativ abtrennen.

9. Isolierung der Dicarbonsäuren

Der Rückstand von der Wasserdampfdestillation wird mit 1n Sodalösung neutralisiert und anschließend lyophilisiert. Die Abtrennung

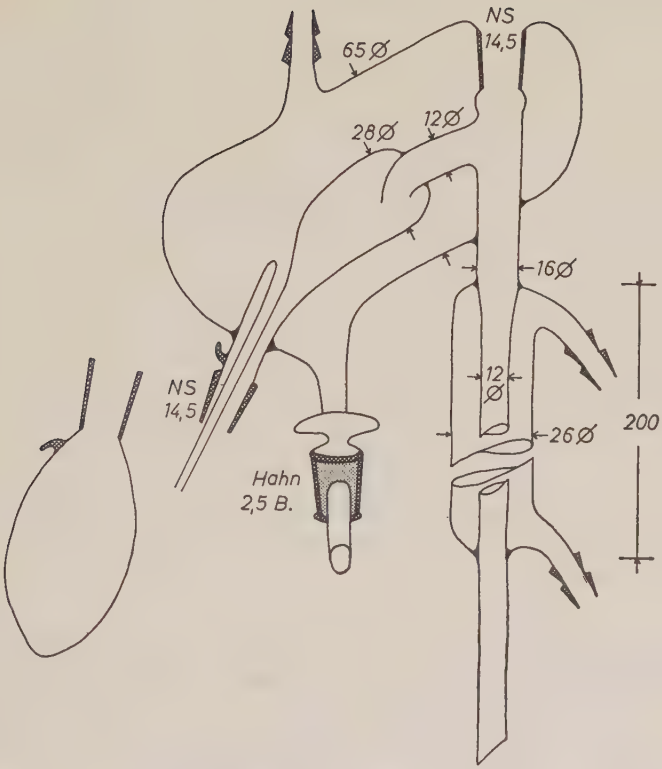


Abb. 9. Apparatur zur Wasserdampfdestillation von Mikromengen. Zahlenangaben in Millimeter.

der Dicarbonsäuren von den großen Mengen anorganischer Salze gelingt erst, wenn man den Trockenrückstand in 5n Schwefelsäure aufnimmt und dann mit Äther ausschüttelt. Bei geringeren Schwefelsäurekonzentrationen sind die Verteilungskoeffizienten zu ungünstig. Aus dem vereinigten Ätherextrakt werden die freien Säuren erhalten.

10. Papierchromatographische Identifizierung der Dicarbonsäuren

Man überführt den Trockenrückstand der Ätherextraktion in die Ammoniumsalze und trägt diese auf. Die Trennung gelingt in zufriedenstellender Weise mit den auf Seite 31 angegebenen Systemen.

11. Herstellung der Monocarbonsäure-methylester

Von der Zerstörung des unverbrauchten Permanganats ist noch Ameisensäure in der Monocarbonsäure-Fraktion enthalten. Diese wird durch Titration mit n/10 Kaliumpermanganat in sodaalkalischer Lösung zerstört. Das vom Braunstein abgetrennte Filtrat wird lyophilisiert. Die Monocarbonsäuren werden durch eine erneute Wasserdampfdestillation von den begleitenden Salzen abgetrennt.

Die Überführung kleinster Mengen (einige γ) von Monocarbonsäuren in die Hydroxamate ist nur schwer quantitativ durchzuführen. Zunächst wird die Menge der Monocarbonsäuren im Wasserdampfdestillat durch Titration mit n/10 Natronlauge bestimmt und dann das Destillat lyophilisiert. Die Salze werden unter Kühlung in 1n Schwefelsäure aufgenommen, Dioxan darübergegeben und dann durch geglühtes Natriumsulfat das Wasser entzogen, so daß die freien Säuren in das Dioxan gehen. Da das Dioxan wesentlich weniger flüchtig ist als Äther, treten keine Verluste an Monocarbonsäuren auf; außerdem sind die Hydroxamate der Monocarbonsäuren in Dioxan löslich. Die in Dioxan gelösten Säuren werden mit einer Lösung von Diazomethan in demselben Lösungsmittel verestert.

12. Überführung der Monocarbonsäure-methylester in die Hydroxamate

Die Lösung der Monocarbonsäure-methylester wird mit dem Hydroxylamin-Reagenz versetzt und die Mischung 30 Minuten bei 25° gehalten. Nach der Neutralisation wird das Dioxan im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in absolutem Methanol aufgenommen.

13. Papierchromatographische Identifizierung der Monocarbonsäuren

Die Identifizierung dieser Spaltprodukte ist mit den auf Seite 29 angegebenen Systemen gut möglich.

Ergebnisse und Diskussion

1. Sorbinol

Als Spaltprodukte des Sorbinols können wie erwartet der NABS-ester des Glykolsäure-methylesters, Oxalsäure und Essigsäure identifiziert werden. Nachdem es schon früher gelungen war, 2 mg der NABS-ester einfach ungesättigter Alkohole zu spalten, die Spaltprodukte zu isolieren und zu identifizieren, ist es jetzt gelungen, nach weiteren Verbesserungen des Verfahrens, mit 1 mg des NABS-esters auszukommen. Außerdem konnte die Oxalsäure vor der Zerstörung im Verlauf der Aufarbeitung bewahrt werden (Chromatogramme siehe Abb. 10).

2. Linolalkohol und Linolenalkohol

Als Spaltprodukte von 1 mg des NABS-esters des Linolalkohols können der NABS-ester des ω-Hydroxy-nonansäure-methylesters und Capronsäure isoliert werden. Der Nachweis der erwarteten Malonsäure gelang nicht. Die Zerstörung erfolgt während der Spaltung selbst und bei der Wasserdampfdestillation zur Abtrennung der Monocarbonsäuren von den Dicarbonsäuren. Nach der Spaltung von 2 mg Linolalkohol kann die Malonsäure isoliert werden.

Nach der Spaltung von 1 mg des NABS-esters des Linolenalkohols können der NABS-ester des ω-Hydroxy-nonansäure-methylesters, Malonsäure und Propionsäure identifiziert werden (Chromatogramme siehe Abb. 10). Der Nachweis der Malonsäure gelingt nur, wenn man 4 Mikromol und mehr erwarten kann. Bei der Spaltung von 1 mg des NABS-esters des Linolalkohols sind es nur 2 Mikromol.

3. Farnesol

Nach der oxydativen Spaltung kann von den erwarteten Spaltprodukten nur der NABS-ester des Glykolsäure-methylesters isoliert werden. Das entstandene Aceton wird mit dem Lösungsmittel abdestilliert.

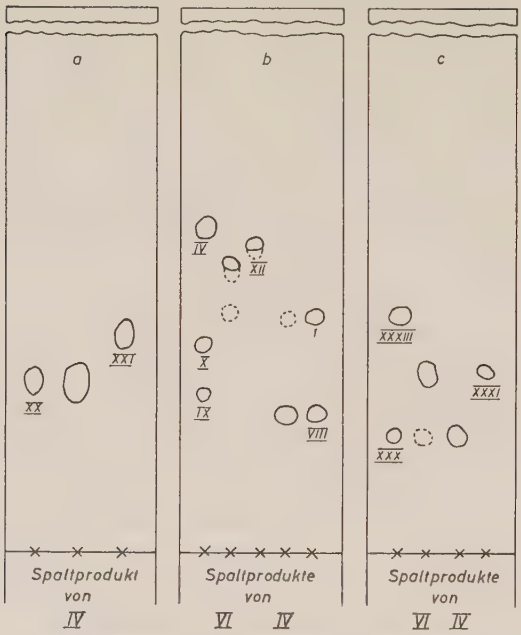
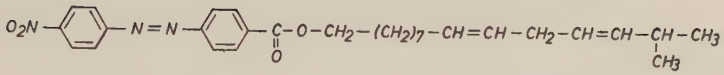


Abb. 10. Papierchromatogramme zur Identifizierung der Spaltprodukte der NABS-ester des Sorbinols und des Linolenalkohols (siehe Anmerkung Abb. 1). a) Dicarbonsäure, System: Propanol (6) und konzentriertes Ammoniak (4). b) NABS-ester-Bruchstück, System: n-Dekan (3) und Pyridin (2). c) Monocarbonsäure, System: Amylalkohol (40), Eisessig (10) und Wasser (50).

Die erwartete Lävulinsäure wird wahrscheinlich während der Oxydation zerstört. Aus entsprechenden Modellansätzen konnte keine Lävulinsäure mehr isoliert werden. Dies ist auch zu erwarten, denn schon bei den ersten Versuchen zur Strukturaufklärung des Farnesols konnte M. Kerschbaum[58] nach der oxydativen Spaltung mit Permanganat nur Aceton, aber keine Lävulinsäure isolieren. Dieses Bruchstück kann nur durch Ozonspaltung[59] erhalten werden.

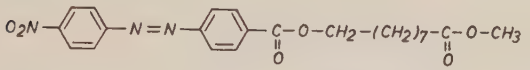
4. Alkohol aus der „Lockstoffsäure"

Nach der oxydativen Spaltung von 300 γ dieses NABS-esters werden der NABS-ester des ω-Hydroxy-nonansäure-methylesters und Isobuttersäure identifiziert. Elementaranalyse sowie das durch UV-Absorp-

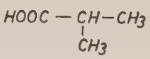


NABS-ester des Alkohols aus der „Lockstoffsäure" (XVII)

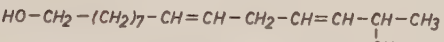
Identifizierte Spaltprodukte:



(XII)



(XXXII)



Alkohol aus der „Lockstoffsäure"

„Lockstoffsäure"

tion bestimmte Äquivalentgewicht stehen in Einklang mit der Struktur eines C_{16}-Dienols.

Danach muß man annehmen, daß das fehlende C-3-Bruchstück eine Dicarbonsäure oder eine Ketosäure ist. Als Dicarbonsäure käme nur die Malonsäure in Frage. Die einzige Ketosäure mit 3 Kohlenstoffatomen ist die Brenztraubensäure. Diese konnte aber in Modellversuchen aus den Ansätzen isoliert werden. Danach ist das C_3-Bruchstück mit aller Wahrscheinlichkeit Malonsäure, deren Nachweis nur gelingt, wenn man 4 Mikromol und mehr als primäre Spaltprodukte erwarten kann. Versuche von Zayed[60] haben diese Vermutung bestätigt, so daß das Derivat als 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des 14-Methyl-pentadekadien-(9.12)-ol-(1) und die „Lockstoffsäure" als 14-Methyl-pentadekadien-(9.12)-säure-(1) identifiziert sind (Chromatogramme siehe Abb. 11).

Damit ist gezeigt, daß die oxydative Spaltung von nur 300 γ eines NABS-esters noch hinreichende Aufschlüsse über die Struktur geben kann. Dies dürfte aber die kleinste gerade noch ausreichende Substanzmenge sein.

5. Sexuallockstoff des Seidenspinners

Vom NABS-ester des Lockstoffes standen 1,9 mg zur oxydativen Spaltung zur Verfügung. Nach der Spaltung werden der NABS-ester

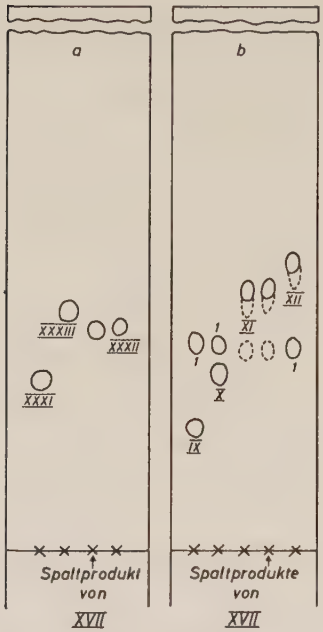
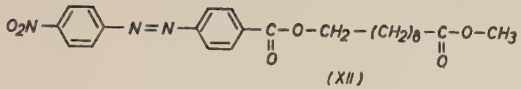


Abb. 11. Papierchromatogramme zur Identifizierung der Spaltprodukte des NABS-ester des Alkohols aus der „Lockstoffsäure" (siehe auch Anmerkung Abb. 1). a) Monocarbonsäure. b) NABS-ester-Bruchstück, System: n-Dekan (3) und Pyridin (2).

des ω-Hydroxy-dekansäure-methylesters, Oxalsäure und Buttersäure identifiziert (Chromatogramme siehe Abb. 12). Danach ist das Derivat des Lockstoffes der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(1)-ester eines Hexadekadien-(10.12)-ols-(1).

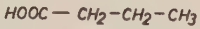
Dieses Ergebnis wird gestützt durch die Elementaranalyse[13] und die Äquivalentgewichtsbestimmung des Derivates, die beide zu einer Summenformel $C_{16}H_{13}O$ für den Lockstoff führen. Das aus dem katalytisch hydrierten Lockstoff hergestellte α-Naphthyl-urethan hat denselben Schmelzpunkt wie das aus reinem Cetylalkohol hergestellte; der Mischschmelzpunkt[61] ergibt keine Depression. Das UV-Spektrum des NABS-esters zeigt zwei konjugierte Doppelbindungen (Maximum bei 331 mμ) an, damit ist auch die Herkunft der identifizierten Oxalsäure eindeutig.

Über die sterische Konfiguration lassen sich noch keine endgültigen Aussagen machen, jedoch läßt das Infrarot-Spektrum des freien Lock-

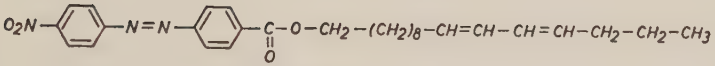


(XII)

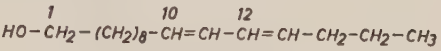
(XX)



(XXXIII)



NABS-ester des Bombykols (XVIII)



Sexuallockstoff des Seidenspinners
Bombykol

stoffes die Vermutung zu, daß eine cis-trans-Konfiguration vorliegt (scharfe Banden bei 10.18 μ und 10.56 μ) [62, 63] *.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das hier mitgeteilte Mikroverfahren die Strukturaufklärung von aliphatischen ungesättigten Alkoholen gestattet. Da nach unseren Erfahrungen Acetessigsäure und Lävulinsäure nicht aus den Spaltungsansätzen isoliert werden können und das Auftreten von Oxalsäure keine eindeutige Aussage erlaubt, bedarf es zur Ergänzung einer Bestimmung des Molekulargewichtes des Derivates. Deren Ergebnis kann bei Vorliegen von genügend Substanz durch die Herstellung eines charakteristischen Derivates des hydrierten Alkoholes ergänzt werden. Für diese Untersuchungen benötigt man nicht mehr Substanz als für eine C,H-Einzelbestimmung, erhält aber viel weitergehende Informationen als aus einer Analyse.

---

* Anmerkung: Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit ist die Konfiguration des Lockstoffes durch seine Synthese ermittelt. A. Butenandt und E. Hecker, Angew. Chem., 73 (1961), 349.

Abb. 12. Papierchromatogramme zur Identifizierung der Spaltprodukte des NABS-ester des Bombykols (XVIII) (siehe auch Anmerkung zur Abb. 1). a) Dicarbonsäure. b) Monocarbonsäure. c) NABS-ester-Bruchstück.

Das Verfahren ist weiterhin zur Strukturaufklärung von Mikromengen ungesättigter Monocarbonsäuren geeignet, wenn man sie mit komplexen Metallhydriden zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert und diese der Spaltung als NABS-ester zuführt.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte wurden, wenn nicht besonders vermerkt, auf der Heizbank nach Kofler bestimmt[84].

Von den Mikroanalysen wurden die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen von Dr. A. Schöller, Kronach/Oberfranken, und die Stickstoff-Bestimmungen von A. Bernhardt in Mülheim/Ruhr ausgeführt.

Versuch 1

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Crotonalkohols (I)

1,59 g Crotonalkohol (22 mMol) vom Sdp. 119—120°, hergestellt durch Reduktion von reinem Crotonaldehyd (Sdp. 100—101°) mit $LiAlH_4$[31], und 9,3 g NABS-chlorid (32 mMol) werden in siedendem wasserfreiem Methylenchlorid gelöst. Nachdem die Lösung auf 30° abgekühlt ist, werden 11 ccm wasserfreies Pyridin langsam hinzugegeben, wobei Erwärmung bis zum Sieden eintritt. Das luftdicht verschlossene Reaktionsgefäß läßt man 24 bis 48 Stunden stehen. Dann nimmt man das Reaktionsgemisch in Äther/Benzol 1:1 auf, filtriert vom entstandenen Niederschlag ab und wäscht diesen noch auf dem Filter mit Benzol aus. Die gesammelten Filtrate werden in einem 2 l Scheidetrichter zur Zerstörung des nicht umgesetzten Säurechlorids und zur Entfernung des Pyridins zweimal mit einer Mischung von 200 ccm Wasser und 100 ccm 1n H_2SO_4 kräftig ausgeschüttelt und dann mit Wasser gewaschen, bis dieses neutral reagiert. Trocknen der Oberphase über wasserfreiem $MgSO_4$ über Nacht. Die auf 300 ccm eingeengte Lösung wird über eine Säule von 3 cm Durchmesser mit 50 g Al_2O_3, neutral, Aktivität III, filtriert. Das Filtrat wird im Eindampfgerät zum Trocknen gebracht. Die Rohausbeute beträgt 7,1 g (21,8 mMol, 99% der Theorie). Nach mehrfacher Umkristallisation aus Cyclohexan/Benzol und Aceton kristallisiert die Verbindung in roten Blättchen, Schmelzpunkt 136°.

$C_{17}H_{15}N_3O_4$ (325.3) Ber.: C 62.74 H 4.65 N 12.92
Gef.: C 62.85 H 4.69 N 13.01

Versuch 2

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Hexen-(3)-ol-(1) (II)

1,002 g Hexen-(3)-ol-(1) (10 mMol) und 3,340 g NABS-chlorid werden nach der von E. Hecker angegebenen Vorschrift in wasserfreiem Benzol umgesetzt.

Es werden 2,61 g des Esters erhalten (8 mMol, 80% der Theorie), die nach mehrfacher Umkristallisation aus Cyclohexan/Benzol und Aceton in roten Blättchen mit einem Schmp. von 129—130° kristallisieren.

$C_{19}H_{19}N_3O_4$ (353.4) Ber.: C 64.57 H 5.42 N 11.89
Gef.: C 64.53 H 5.46 N 12.13

Versuch 3

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Petrosilinalkohols (III)

3 kg fein gepulverter Petersiliensamen werden mit Petroläther (Sdp. 30 bis 40°) vollständig extrahiert. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels bleiben 740 g eines charakteristisch riechenden Öls. Davon werden 200 g mit 60 g KOH in 500 ccm Äthanol durch dreistündiges Kochen verseift, der Alkohol abdestilliert und das Unverseifbare durch Ausschütteln mit Äther abgetrennt. Nach Ansäuren der wässrigen Phase mit 4n H_2SO_4 wird mit Äther mehrfach ausgeschüttelt und die gelbe Lösung über wasserfreiem $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers kristallisieren im Kühlschrank 140 g eines Fettsäuregemisches. Zur Abtrennung der gesättigten Fettsäuren wird das Gemisch zu einer erwärmten Lösung von 286 g Quecksilberacetat in 192 ccm Methanol und 98 ccm Eisessig gegeben und das Gemisch auf dem Wasserbad erwärmt. Nach zwei Tagen haben sich die Quecksilberacetataddukte der Fettsäuren als klebriger gelber flockiger Niederschlag abgeschieden. Er wird von den in Lösung gebliebenen Quecksilberacetataddukten der ungesättigten Fettsäuren abgesaugt. Durch Zugabe von 142 ccm rauchender HCl (D = 1,19) und Erwärmen auf dem Dampfbad werden die Addukte gespalten. Man schüttelt die Fettsäuren mit Petroläther (Sdp. 60—70°) aus, filtriert und trocknet über wasserfreiem $MgSO_4$, destilliert das Lösungsmittel ab und verseift die im Gemisch enthaltenen Methylester durch dreistündiges Erhitzen auf dem Dampfbad mit dem zweieinhalbfachen Volumen 2n KOH. Unverseifbare Bestandteile werden durch mehrfaches Ausschütteln mit Äther abgetrennt, dann säuert man die wässrige Phase mit 2n H_2SO_4 an, schüttelt die Fettsäuren mit Petroläther aus, wäscht mit Wasser nach und trocknet über wasserfreiem $MgSO_4$. Nach dem Abdestillieren des Petroläthers erhält man eine Petrosilinsäure, die noch 0,4% gesättigter Fettsäuren enthält. Zur Abtrennung geringer Mengen höher ungesättigter Fettsäuren wird bei + 2° so lange aus Aceton umkristallisiert, bis die Kristalle konstant bei 31° schmelzen und bei 29° wieder erstarren. Es werden 70 g reine Petrosilinsäure gewonnen. Aus den Mutterlaugen erhält man weitere 30 g der Säure.

Aus 50 g Petrosilinsäure werden nach der Vorschrift von Nystrom und Brown[31] durch Reduktion mit $LiAlH_4$ etwa 45 g Petrosilinalkohol erhalten. Er destilliert bei 164°/0,8 Torr und kondensiert als klare farblose Flüssigkeit, die bei + 2° durchkristallisiert.

2,69 g Petrosilinalkohol (10 mMol) und 4,34 g NABS-chlorid (15 mMol) werden entsprechend der Vorschrift von E. Hecker in wasserfreiem Benzol umgesetzt. Nach der Aufarbeitung werden 4,94 g des NABS-esters (9,4 mMol,

94% der Theorie) erhalten. Die Verbindung kristallisiert nach mehrfacher Umkristallisation aus Hexan und Aceton in kleinen roten Blättchen vom Schmp. 88—89°.

$C_{31}H_{43}N_3O_4$ (521.7) Ber.: C 71.36 H 8.32 N 8.06
Gef.: C 71.51 H 8.37 N 8.20

Versuch 4

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Sorbinols (IV)

In Parallelversuchen werden Sorbinol und Dekanol nach der Vorschrift von E. Hecker in Benzol sowie nach Versuch 1 in Methylenchlorid mit dem NABS-chlorid umgesetzt. In der nachstehenden Tabelle werden Ausbeuten und Schmelzpunkte der Reaktionsprodukte aus beiden Ansätzen gegenübergestellt.

Alkohol	Umsetzung in	Roh-Ausbeute	Ausbeute und Schmelzpunkt 1. Umkristall.	2. Umkristall.
Sorbinol	Methylenchlorid	105%	60% Schmp. 145-47°	46% Schmp. 149-50°
	Benzol	87%	53% Schmp. 150-51°	48% Schmp. 157-58°
Dekanol	Methylenchlorid	89%	75% Schmp. 110-11°	
	Benzol	85%	73% Schmp. 111°	

Man sieht daraus, daß bei der Umsetzung ungesättigter Alkohole die besseren Ergebnisse in Benzol erzielt werden. Für die weiteren Untersuchungen wird der in Benzol umgesetzte NABS-ester des Sorbinols mit einem Schmp. 158—59° verwandt.

Versuch 5

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Linolalkohols (V)

Der NABS-ester wird nach der Vorschrift von E. Hecker aus 2,80 g Linolalkohol (10 mMol) und 4,34 g NABS-chlorid (15 mMol) durch Umsetzung in 105 ccm wasserfreiem Benzol unter Zugabe von 1,8 ccm wasserfreiem Pyridin hergestellt. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Aceton, Aceton, dem einige Tropfen Wasser zugegeben sind und aus einem Gemisch von Aceton und Nitromethan werden kleine rote Blättchen mit einem Schmp. 79—80° erhalten. Insgesamt gewinnt man 2,672 g des analysenreinen Präparates, das sind 52% d. Th.

$C_{31}H_{41}N_3O_4$ (519.7) Ber.: C 71.64 H 7.95 N 8.09
Gef.: C 71.62 H 7.86 N 8.10

Versuch 6

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Linolenalkohols (VI)

Der NABS-ester wird in derselben Weise wie der des Linolalkohols durch Umsetzung von 2,78 g Linolenalkohol (10 mMol) mit 4,34 g NABS-chlorid (15 mMol) in 105 ccm absolutem Benzol unter Zugabe von 1,8 ccm absolutem Pyridin hergestellt. Nach der Umkristallisation mit denselben Lösungsmitteln werden 1,729 g des analysenreinen Präparates erhalten, das sind 34 % der theoretischen Ausbeute. Dieser niedere Wert ist auf die Schwierigkeiten bei der Reinigung des Umsetzungsproduktes zurückzuführen. Der NABS-ester kristallisiert in kleinen roten Blättchen mit einem Schmelzpunkt 74—75°.

$C_{31}H_{39}N_3O_4$ (517.7) Ber.: C 71.87 H 7.60 N 8.12
Gef.: C 71.40 H 7.70 N 8.03

Versuch 7

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Glykolsäure-methylesters (VIII)

478 mg Glykolsäure-methylester (5,3 mMol), hergestellt durch Umsetzung der freien Säure mit Diazomethan in Tetrahydrofuran, werden mit 3200 mg NABS-chlorid umgesetzt (siehe Versuch 1). Man erhält 1076 mg (59 % d. Th.) des NABS-esters. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Benzol und Cyclohexan kristallisiert die Verbindung in rubinroten Prismen mit Schmp. 148°.

$C_{16}H_{13}N_3O_6$ (343.3) Ber.: C 55.98 H 3.82 N 12.24
Gef.: C 56.17 H 3.88 N 12.49

Versuch 8

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des β-Hydroxy-propionsäure-methylesters (IX)

Die β-Hydroxy-propionsäure wird durch Verseifen des Äthylencyanhydrins dargestellt. Sie enthält noch 20 % nicht entfernbares Wasser und wird deshalb mit Diazomethan verestert. 520 mg β-Hydroxy-propionsäure-methylester (5 mMol) werden mit 2165 mg NABS-chlorid (7,5 mMol) in 28 ccm Methylenchlorid unter Zugabe von 2,75 ccm wasserfreiem Pyridin in der in Versuch 1 beschriebenen Weise umgesetzt. Es werden 1,605 g (4,5 mMol) (90 % d. Th.) des NABS-esters erhalten, die nach mehrfacher Umkristallisation aus Benzol und Cyclohexan einen Schmp. 147—148° haben. Der Mischschmp. mit dem analysenreinen NABS-ester des Glykolsäure-methylesters liegt bei 138°.

$C_{17}H_{15}N_3O_6$ (357.3) Ber.: N 11.76
Gef.: N 11.73

Versuch 9

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des ε-Hydroxy-capronsäure-methylesters (X)

a. ε-Hydroxy-capronsäure-methylester

Da die Darstellung recht schwierig ist, wird sie hier besonders ausführlich beschrieben.

Ausgangssubstanzen: Kalium-Salz des Adipinsäure-halbesters 115 g (0,7 Mol), Natrium 60 g, absoluter Alkohol 1000 ccm, Acetanhydrid 150 ccm, Ligroin (Sdp. 100—120°) 1000 ccm, absolutes Methanol, halbgesättigt mit HCl, 125 ccm.

Ausführung: In einem 3 l Dreihalskolben, versehen mit einem Rückflußkühler NS 26, der mit einem $CaCl_2$-Rohr verschlossen ist, einem mechanischen Rührer und einem Einwurf für das Natrium, wird das Kalium-Salz in 500 ccm absolutem Äthanol gelöst und die Lösung in einem wegnehmbaren Sandbad zum Sieden gebracht. Im Laufe von 1/2 Std. wird das Natrium in kleinen Stücken eingetragen und währenddessen weitere 500 ccm absoluter Alkohol hinzugebeben. Nach einer weiteren 1/2 Std. Rühren wird langsam wässriger Alkohol und schließlich destilliertes Wasser hinzugegeben, bis eine klare, bräunliche Lösung entsteht. Man destilliert den Alkohol ab, nimmt den Rückstand mit weiterem Wasser auf und schüttelt zur Entfernung neutraler Bestandteile mit Äther aus. Die wässrige Lösung wird mit 260 ccm 10n H_2SO_4 angesäuert. Dann wird mit Äther ausgeschüttelt, den man mit destilliertem Wasser wäscht und über $MgSO_4$ trocknet. Der Äther wird abdestilliert, und es bleibt ein gelbbrauner Rückstand, der ε-Hydroxy-capronsäure enthält. Diesen kocht man 2 Stdn. mit Acetanhydrid und schüttelt das entstandene Gemisch 5mal mit je 200 ccm Ligroin aus. Nach dem Abdampfen des Ligroins im Vakuum bleiben 20 g acetylierte ε-Hydroxy-capronsäure. Sie wird mit 125 ccm der alkolischen HCl 2 Stdn. gekocht, das Reaktionsprodukt in einen mit Wasser gefüllten Scheidetrichter gegeben und die Lösung mit fester Soda neutralisiert, wobei eine milchige Trübung entsteht. Die Lösung wird 4mal mit 250 ccm Äther ausgeschüttelt, der Äther mit Wasser nachgewaschen und über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers bleiben 12 g ε-Hydroxy-capronsäure-methylester. Bei der 2. Destillation werden 8,1 g einer farblosen klaren Flüssigkeit vom Sdp. $_{7\ Torr}$ 95°, $n_D^{23°}$ 1,4298 erhalten.

b. 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester des ε-Hydroxy-capronsäure-methylesters

732 mg ε-Hydroxy-capronsäure-methylester (5 mMol) und 2165 mg NABS-chlorid (7,5 mMol) werden in 28 ccm Methylenchlorid unter Zugabe von 2,75 ccm Pyridin auf die in Versuch 1 beschriebene Weise umgesetzt. Es werden 627 mg (1,6 mMol) des NABS-esters erhalten, der nach mehrfacher Umkristallisation aus Cyclohexan/Benzol 1 : 1 und Aceton in roten Prismen mit einem Schmp. 123—124° kristallisiert.

$C_{20}H_{21}N_3O_6$ (399.4) Ber.: C 60.14 H 5.30 N 10.52
Gef.: C 60.27 H 5.20 N 10.61

Versuch 10

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylesters (XIII)

a. Natriumsalz des Methylmalonsäure-monoäthylesters

Die Verbindung wird aus dem Methylmalonsäure-diäthylester mit einer äquimolaren Menge von Natriumhydroxyd in absolutem Äthanol in Analogie

zu der Darstellung des Kaliumsalzes von F. Margnoy hergestellt und die Reinheit des erhaltenen Salzes durch potentiometrische Titration mit n/10 HCl geprüft.

b. α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylester

Zur Reinigung und anschließenden Entwässerung des Diäthylenglykoldimethyläthers (Diglyme) wird dieser nach der Destillation ($Sdp._{740}$ 160 bis 162°) in einem Kolben mit CaH_2 gegeben, den man mit einem $CaCl_2$-Rohr verschließt und 24 Stdn. stehen läßt. Dann wird der Äther unter Feuchtigkeitsausschluß abdestilliert und auf $LiAlH_4$ gestellt. Davon wird er nach 24 Stdn. unter vermindertem Druck ($Sdp._{35}$ 75°) bei gleichzeitigem Durchleiten von getrocknetem Stickstoff unter Feuchtigkeitsausschluß abdestilliert. Das Destillat wird sofort als Lösungsmittel für die Reduktion verwandt.

In 3 ccm absolutem Diglyme lösen sich 5 mg des Natriumsalzes des Methylmalonsäure-monoäthylesters, also 1000 mg in 600 ccm. In einem 1 l Dreihalskolben, versehen mit einem durch ein $CaCl_2$-Rohr verschlossenen Rückflußkühler, einem mechanischen Rührer, einem Tropftrichter mit Druckausgleich und einem Thermometer zur Messung der Innentemperatur werden 600 ccm absolutes Diglyme, 256 mg Natriumborhydrid (76 mMol) und 200 mg des Natriumsalzes des Methylmalonsäure-monoäthylesters (12 mMol) gegeben. Dann wird 2 Stdn. unter Erwärmen auf dem Dampfbad gerührt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wird tropfenweise aus dem Tropftrichter 6,2 ccm einer Lösung von wasserfreiem Aluminiumchlorid in Diglyme (670 mg in 25 ccm) hinzugegeben und die Tropfenfolge so geregelt, daß die Innentemperatur nicht über 50° steigt. Nach Zugabe der Aluminiumchlorid-Lösung wird 1 Std. bei Raumtemperatur und anschließend 2 Stdn. unter Erhitzen auf dem Dampfbad gerührt. Dann bleibt der Ansatz über Nacht stehen. Am folgenden Morgen wird mit 5n HCl hydrolysiert. Die Diglyme-Schicht wird abgetrennt. Nach dem Abdestillieren des Diglyme bleibt ein Rückstand von etwa 2 ccm. Dieser wird unter Eiskühlung so lange mit Diazomethan in Äther versetzt, bis die Gelbfärbung bestehen bleibt und die weitere Zugabe keine heftige Gasentwicklung mehr bewirkt. Der Ansatz bleibt über Nacht stehen. Auf diese Weise wird etwa noch vorhandene Salzsäure zerstört. Das überschüssige Diazomethan wird mit Essigsäure verestert und das Lösungsmittel abdestilliert. Es bleiben 1,27 g eines Rohproduktes, das als NABS-ester gereinigt wird.

c. 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

1,27 g des Rohproduktes des α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylesters (etwa 10 mMol) werden nach der Vorschrift von E. Hecker mit 4,34 g NABS-chlorid (15 mMol) in 105 ccm wasserfreiem Benzol unter Zugabe von 1,8 ccm absolutem Pyridin umgesetzt. Die chromatographische Reinigung erfolgt wie bei dem NABS-ester des Glykolsäure-methylesters auf saurem Al_2O_3, Aktivität III. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Cyclohexan/Benzol-Gemischen und schließlich aus Benzol/Cyclohexan 1 : 1 werden 52 mg eines analysenreinen in roten glänzenden Blättchen kristallisierenden Präparates mit einem Schmp. von 146° erhalten.

$C_{18}H_{18}N_3O_6$ (372.4) Ber.: C 58.06 H 4.87 N 11.29
Gef.: C 58.44 H 4.70 N 11.31

Versuch 11

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Hydroxy-acetons (XIV)

370 mg Hydroxyaceton werden in 700 ccm wasserfreiem Benzol mit 2100 mg NABS-chlorid unter Zusatz von 1,2 ccm wasserfreiem Pyridin nach der Vorschrift von E. Hecker umgesetzt. Die chromatographische Reinigung erfolgt wieder auf einer Säule von saurem Al_2O_3, Aktivität III, wobei man zur Elution viel Benzol benötigt. Nach der Umkristallisation aus Benzol, in dem der NABS-ester überraschenderweise schwer löslich ist, werden 1222 mg (74% d. Th.) eines Präparates mit einem Schmp. 166° erhalten. Bei weiterem Umkristallisieren aus Aceton bleibt der Schmp. konstant.

$C_{16}H_{13}N_3O_5$ (327.3) Ber.: C 58.71 H 4.01 N 12.84
Gef.: C 58.91 H 4.10 N 12.47

Versuch 12

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Butanol-(1)-ons-(3) (XV)

a. Äthylenketal des Butanol-(1)-ons-(3)

In einem 1 l Dreihalskolben, versehen mit einem durch ein $CaCl_2$-Rohr verschlossenen Rückflußkühler, mechanischem Rührer und Tropftrichter mit Druckausgleich, werden in 200 ccm absolutem Äther 5,7 g $LiAlH_4$ aufgeschwemmt. Dann werden 35 g Acetessigester-äthylenketal (0,2 Mol) so zugegeben, daß am Kühler mäßiger Rückfluß entsteht. Nach der letzten Ketalzugabe wird eine weitere Std. gerührt. Anschließend zerstört man mit einigen Tropfen Wasser das überschüssige $LiAlH_4$ und neutralisiert den Kolbeninhalt vorsichtig mit verdünnter HCl. Nun gibt man 140 g Natrium-kalium-tartrat, in möglichst wenig Wasser gelöst, langsam unter Rühren hinzu. Dabei löst sich der größte Teil des Niederschlages auf, die Ätherschicht wird abgetrennt und die wässrige Phase zentrifugiert. Der Überstand wird zusammen mit den Waschwassern des Niederschlages etwa 10mal mit 50 bis 75 ccm Äther ausgeschüttelt. Der Äther wird über $MgSO_4$ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers wird der Rückstand im Vakuum destilliert, Sdp.$_{9\ Torr}$ 82—85°. (Literaturangabe: Sdp.$_{11\ Torr}$ 85—87°). Die Ausbeute beträgt 13 g (0,075 Mol), das sind 38% der Theorie.

b. Butanol-(1)-on-(3)

15 g des Ketals werden nach der Vorschrift von L. Willimann und H. Schinz gespalten und das erhaltene Butanol-(1)-on-(3) durch Destillation gereinigt. (Sdp.$_{1\ Torr}$ 60—62,5°.)

c. 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

440 g des Butanol-(1)-ons-(3) (5 mMol) werden nach der Vorschrift von E. Hecker mit 2150 mg NABS-chlorid (7,5 mMol) in 70 ccm wasserfreiem Benzol unter Zugabe von 1,2 ccm absolutem Pyridin umgesetzt. Die chromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgt über 75 g saures Al_2O_3, Aktivität III, durch Eluieren mit Benzol. Es werden 720 mg (40% d. Th.) des

analysenreinen NABS-esters erhalten. Nach mehrfacher Umkristallisation aus Benzol und aus Aceton liegt der Schmp. bei 145°.

$C_{17}H_{15}N_3O_5$ (341.3) Ber.: C 59.82 H 4.43 N 12.31
Gef.: C 59.70 H 4.56 N 12.48

Versuch 13

Darstellung des 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-esters des Pentanol-(1)-ons-(4) (XVI)

501 mg des Pentanol-(1)-on-(4) (5 mMol) Sdp. $_{26\ Torr}$ 111—116°); $n_D^{21°}$ = 1,439) werden nach der Vorschrift von E. Hecker mit 2100 mg NABS-chlorid (7,5 mMol) in 70 ccm wasserfreiem Benzol unter Zugabe von 1,2 ccm absolutem Pyridin umgesetzt. Die chromatographische Reinigung des Rohproduktes erfolgt auf einer Säule mit 50 g Al_2O_3 (sauer) Aktivität III durch Elution mit Benzol. Umkristallisation aus Benzol/Cyclohexan 1 : 1, 1 : 5 und Wasser/Aceton 1 : 6. Die Ausbeute nach der ersten Umkristallisation beträgt 1,139 g, das sind 65% der theroretischen Ausbeute. Das analysenreine Präparat kristallisiert in roten Nädelchen. Schmp. 120,5—121,5°.

$C_{18}H_{17}N_3O_5$ (355.4) Ber.: C 60.83 H 4.82 N 11.82
Gef.: C 60 91 H 4.76 N 11.84

Versuch 15

Die Identifizierung der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester

Lösungmittelsystem: n-Dekan(3), Pyridin(2).

Das Dekan muß durch Ausschütteln mit konzentrierter Schwefelsäure von ungesättigten Kohlenwasserstoffen gereinigt werden. Anschließend wird es durch Destillation und Aufbewahren über CaH_2 völlig von Wasser befreit. Das Pyridin wird in der beschriebenen Weise[19] völlig entwässert. Papier: Schleicher und Schüll 2043 b acetyliert.

Eine optimale Trennung ist nur bei einem bestimmten Feuchtigkeitsgehalt des Papiers zu erzielen. Die Bogen werden darum 30 Min. bei 100° getrocknet und dann je nach Luftfeuchtigkeit 12 bis 24 Stdn. im trockenen Raum aufbewahrt. Entwickeln: 12 Stdn. aufsteigend.

Nachweis der Flecken: entweder durch die rote Farbe der NABS-ester oder durch deren Adsorption im durchfallenden UV-Licht.

Versuch 16

Lösungen: A. 1n $NH_2OH \cdot HCl$ (7 g in 100 ccm Methanol gelöst)
B. 1n KOH (11,2 g in 200 ccm Methanol gelöst)
C. Tetrahydrofuran/Eisessig 4 : 1
D. Hydroxylaminlösung: 1 Vol. Teil A. und 2 Vol. Teile B. werden gemischt und das entstehende KCl abgesaugt. Diese Lösung hält sich nur wenige Stunden.

Veresterung der Fettsäuren:

Je 1 mMol der in Dioxan gelösten Fettsäuren wird mit 1 mMol Diazomethan in Dioxan verestert (in 2 g KOH in 3 ccm Wasser gelöst werden nach dem

Überschichten mit 16 ccm Dioxan unter Kühlung in einer Eis-Kochsalzmischung 1,6 g Nitrosomethylharnstoff eingetragen. Die Dioxanlösung enthält dann 11 mMol Diazomethan, 1 ccm enthält 0,7 mMol).

Herstellung der Hydroxaminsäuren:

Zu 1 mMol Ester gibt man 3 ccm der Lösung D und hält die Mischung 30 Min. bei 25°. Dann neutralisiert man mit C, wobei man pro 3 ccm von D 0,3 ccm von C verbraucht. Die neutralisierte Lösung kann zur Chromatographie aufgetragen werden.

Versuch 17

Identifizierung methylverzweigter Monocarbonsäuren von C_1 bis C_6

Lösungsmittelsystem: n-Octylalkohol p. a. (75), Wasser (75), n-Heptan (5), Ameisensäure (25).

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b.

Entwickeln: In der Horizontalkammer nach Grassmann und Strobel wird der eingespannte Bogen zunächst 8 Stdn. mit Wasserdampf gesättigt und dann die organische Oberphase des Systems zum Entwickeln in den dazu vorbereiteten Trog gegeben. Die Laufzeit beträgt zwischen 30 und 40 Stdn. Zur Wärmeisolierung wird die Chromatographiekammer in einen mit Stanniolfolie überzogenen Holzkasten gestellt. Nachweis der Flecken: Das Papier wird 5 Min. bei 90° getrocknet und dann mit einer 2 proz. $FeCl_3$-Lösung in Äthanol/n-Butanol (4 : 1) besprüht.

Versuch 18

Identifizierung der höheren Monocarbonsäuren von C_9 bis C_{22}

Lösungmittelsystem: Essigsäure-äthylester (12), Tetrahydrofuran (70), Wasser (94) und Eisessig (9). Sie bilden ein einphasiges System.

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b acetyliert.

Entwickeln: Nach 2stündigem Sättigen wird aufsteigend entwickelt. Nach 28 Stdn. beträgt die Steighöhe 28 cm. Fleckennachweis: wie bei Versuch 17.

Versuch 19

Identifizierung der Dicarbonsäuren

a. Oxalsäure und Malonsäure

Lösungsmittelsystem: Propanol (6), konzentriertes Ammoniak (4).

Papier: Whatman Nr. 1.

Entwickeln: Absteigend 45 bis 55 Stdn.

Nachweis der Flecken: Die Säuren werden durch Besprühen mit einem Gemisch aus 2 g Glucose, 2 ccm Anilin, 20 ccm Wasser, 20 ccm Äthanol und 60 ccm n-Butanol und anschließendes Erhitzen auf 115° als dunkelbraune Flecken auf weißem Untergrund angefärbt.

b. Bernsteinsäure bis Sebacinsäure

Lösungsmittelsystem: Äthanol (80), 16proz. wässriges Äthylamin (20).

Papier: Whatman Nr. 1.

Entwickeln: 22 Stdn. absteigend.

Nachweis der Flecken: wie bei a.

Tabelle 4

Dicarbonsäure	R_S-Wert
Sebacinsäure	1,0
Adipinsäure	0,75
Glutarsäure	0,66
Bernsteinsäure	0,56

Versuch 20

Oxydative Spaltung der 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester ungesättigter aliphatischer Alkohole mit anschließender Isolierung und Identifizierung der Spaltprodukte

1. Oxydative Spaltung mit Kalium-permanganat

In ein Zentrifugenglas mit Schliff werden 1 mg des NABS-esters eingewogen und 0,3 ccm getrocknetes Aceton p. a. sowie ein Siedestäbchen hinzugegeben. In das Glas wird ein als Rückflußkühler wirkender Kühlfinger eingesetzt, dessen äußere Öffnung durch ein $CaCl_2$-Rohr verschlossen ist. Das Derivat löst sich beim Erwärmen. Dann wird die Apparatur in eine Trockeneis/Aceton Kältemischung gehalten, der Kühlfinger herausgenommen, abgestrichen und in ein trockenes Zentrifugenglas gesteckt. Durch einen Trichter werden in die Acetonlösung ein Sechstel von 100 mg fein gepulvertem $KMnO_4$ p. a. eingetragen. Die Apparatur wird wieder mit dem Kühlfinger verschlossen und in ein Glycerin-Bad von 65° auf einer automatisch regulierten Heizplatte 2 cm tief eingetaucht. Nach 15 Minuten trägt man nach vorheriger Abkühlung in der Kältemischung ein weiteres Sechstel des $KMnO_4$ ein und erhitzt anschließend die Apparatur wieder in dem Glycerin-Bad. Diese Operation wird noch 4mal wiederholt. Nach 75 Minuten gibt man mit dem letzten $KMnO_4$ noch 0,1 ccm Aceton hinzu und erhitzt weitere 5 Stdn. am Rückflußkühler.

2. Abdestillieren des Lösungsmittels und der Ketone, Zerstörung des überschüssigen Permanganats

Nach Abkühlen in der Kältemischung wird die Apparatur geöffnet und das Zentrifugenglas mit der vorne beschriebenen Hochvakuumanlage verbunden. Bei einem Vakuum von 2×10^{-1} Torr wird das Aceton in eine Kühlschlange abdestilliert und bei 3×10^{-3} Torr die möglicherweise entstandenen Ketone. Nach beendeter Destillation wird auf das Zentrifugenglas mit dem trockenen Rückstand der Kühlfinger aufgesetzt. Durch seine Öffnung wird ein Polyäthylenschlauch eingeführt, durch den man zur Zerstörung des nicht verbrauchten $KMnO_4$ 0,2 ccm verdünnte Ameisensäure (1,2 mMol/ccm) einspritzt, durch Lufteinblasen durchmischt. Man wiederholt dies mit 0,2 ccm und 0,1 ccm verdünnter Ameisensäure, so daß insgesamt 0,6 mMol zugegeben werden. Nach beendeter Zugabe ist der Inhalt des Zentrifugenglases sauer.

3. Extraktion der Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren

Zur Extraktion der bei der Spaltung entstandenen Monocarbonsäuren, Dicarbonsäuren und Ketosäuren werden langsam 0,2 ccm 3,6 n $KHCO_3$ eingespritzt, zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, der Rückstand zur weiteren Extraktion zweimal mit 0,5 ccm 1 n $KHCO_3$ gewaschen, zentrifugiert und abpipettiert. Die Überstände werden im Kolben der Apparatur zur Wasserdampfdestillation vereinigt. Zum Nachweis von Ketosäuren entnimmt man gegebenenfalls $^1/_5$ des Inhalts und lyophilisiert.

4. Isolierung des Derivatbruchstückes

Das Zentrifugenglas mit dem Rückstand der $KHCO_3$-Extraktion wird mit einem Kühlfinger verschlossen, durch dessen Öffnung ein Polyäthylenschlauch auf den Grund des Glases geführt wird. In diesen Schlauch werden langsam viermal 0,2 ccm 1n H_4SO_2 eingespritzt und zwischendurch der Glasinhalt durch Lufteinblasen durchmischt. Zur Zerstörung des Braunsteins wird SO_2 eingeleitet. Die Apparatur ist in Abbildung 7 dargestellt. Das Derivatbruchstück fällt als roter Niederschlag aus, der nach dem Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes mehrfach mit Wasser gewaschen und durch Lyophilisieren getrocknet wird.

5. Veresterung des Derivatbruchstückes

Der trockene Niederschlag des NABS-esters wird in 0,2 ccm Methylenchlorid aufgelöst und mit Diazomethan in Methylenchlorid (0,7 mMol Diazomethan pro 1 ccm) verestert; dabei geht der Niederschlag in Lösung. Man läßt 2 Stdn. stehen und dampft das Methylenchlorid bei vermindertem Druck ab. Der Rückstand wird in möglichst wenig Benzol aufgenommen und auf eine Säule von 8 mm Durchmesser, in die 10 g sauren Al_2O_3 Aktivität III mit wasserfreiem Benzol eingeschlemmt wurde, aufgebracht und mit Benzol eluiert. Dabei werden das nicht umgesetzte Diazomethan zerstört und alle bei der Veresterung entstandenen Verunreinigungen abgetrennt. Nach dem Abdestillieren des Benzols wird der Rückstand in 0,2 ccm Benzol aufgenommen und zur papierchromatographischen Identifizierung verwandt.

6. Chromatographische Identifizierung des Derivatbruchstückes

Die Ausführung ist in Versuch 15 beschrieben. Es werden bei der Spaltung des Alkoholderivats aus der Lockstoffsäure das Derivat des ω-Hydroxynonansäure-methylesters und bei der Spaltung des Sexuallockstoffes des Seidenspinners Bombyx mori das Derivat des ω-Hydroxy-dekansäure-methylesters isoliert und identifiziert.

7. Prüfung auf Ketosäuren

Der lyophilisierte Salzrückstand von 3. wird in dem Glas [5 a] der Apparatur [5] mit 0,1 ccm 1n H_2SO_4 aufgenommen und mit 0,03 ccm 2.4-Dinitrophenylhydrazin-Reagenz in H_3PO_4 und Äthanol versetzt. Man läßt den Ansatz verschlossen mit 5 c über Nacht stehen und trennt einen sich gegebenenfalls bildenden Niederschlag durch Zentrifugieren in der Apparatur [5] ab. Der Niederschlag läßt sich durch einfaches Zentrifugieren im Spitzglas nicht von der H_3PO_4 trennen.

8. Abtrennung der Monocarbonsäuren von den Dicarbonsäuren

Die vereinigten Überstände der $KHCO_3$-Extraktion (3.) werden mit 2 ccm 1n H_2SO_4 angesäuert und in die Apparatur (Abb. 9) zur Wasserdampfdestillation gegeben. Man bläst so lange Dampf ein bis 100 ccm Destillat übergegangen sind. Dann läßt man die Apparatur erkalten und spült von dem Verschluß V aus die möglicherweise noch im Anfangsteil des Kühlers haftenden höheren Fettsäuren mit Äther herunter. Das Destillat wird dann mit n/10 NaOH gegen Phenolphthalein titriert.

9. Isolierung der Dicarbonsäuren

Der Rückstand der Wasserdampfdestillation wird mit 2 ccm 1n K_2CO_3 neutralisiert und lyophilisiert. Der trockene Rückstand wird in ein Zentrifugenglas überführt. Er enthält reichlich anorganische Salze. Der Rückstand wird unter Eiskühlung in 2 ccm Wasser gelöst und mit 0,5 ccm konz. H_2SO_4 p. a. versetzt und 6mal mit 5 ccm Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden mit weiteren 20 ccm Äther verdünnt und mehrmals mit wenig Wasser kongoneutral gewaschen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand während der Nacht im Vakuum über KOH getrocknet. Der Rückstand wird in 20 µl verdünntem Ammoniak aufgenommen. Von dieser Lösung werden etwa 15 µl zur Papierchromatographie aufgetragen.

10. Papierchromatographische Identifizierung der Dicarbonsäuren

Die Durchführung ist in Versuch 19 a und 19 b beschrieben.

11. Herstellung der Monocarbonsäure-methylester

Das Wasserdampfdestillat wird mit 2 g festem Na_2CO_3 p. a. alkalisiert, auf dem Wasserbad erhitzt und zur Zerstörung der überschüssigen Ameisensäure mit n/10 $KMnO_4$ titriert, vom abgeschiedenen Braunstein wird abfiltriert. Das Gemisch aus K_2CO_3 und den Kaliumsalzen der Monocarbonsäuren wird in den Kolben der Wasserdampfdestillations-Apparatur überführt, mit 3 ccm 1n H_2SO_4 versetzt und die Wasserdampfdestillation wie bei 9 wiederholt. Die 100 ccm Wasserdampfdestillat werden mit n/10 NaOH titriert und über Nacht lyophilisiert. Der Salzrückstand wird in ein Zentrifugenglas überführt und mit 0,4 ccm 1n H_2SO_4 versetzt. Man rührt längere Zeit um, zentrifugiert und pipettiert den Überstand ab. Das Sediment wird noch 2mal mit 0,6 ccm wasserfreiem Dioxan in derselben Weise nachgewaschen. Die vereinigten Dioxanlösungen werden mit Diazomethan in Dioxan verestert, indem man so lange in kleinsten Mengen von dem Reagenz hinzugibt, bis leichte Gelbfärbung eintritt und nur noch eine minimale Gasentwicklung vorhanden ist.

12. Überführung in die Monocarbonsäurehydroxamate

Zu der Lösung der Monocarbonsäure-methylester in Dioxan werden 0,6 ccm Hydroxylaminreagenz (Versuch 16, Lösung D) gegeben und die Mischung 30 Min. bei 25° gehalten. Danach wird mit 0,06 ccm Eisessig in Tetrahydrofuran (C) neutralisiert. Das Dioxan wird im Vakuum abgedampft und der Rückstand in absolutem Methanol aufgenommen.

13. Papierchromatographische Identifizierung der Monocarbonsäuren

Von der methanolischen Lösung der Monocarbonsäurehydroxamate wird etwa die Hälfte aufgetragen und nach der in Versuch 17 beschriebenen Weise chromatographiert.

Zusammenfassung

1. Es wird eine Mikromethode zur Strukturaufklärung von alephatischen ungesättigten Alkoholen durch oxydative Spaltung ihrer 4'-Nitro-azobenzol-carbonsäure-(4)-ester (NABS-ester) mit Kaliumpermanganat in wasserfreiem Aceton, anschließender Isolierung und papierchromatographischer Identifizierung der Spaltprodukte mitgeteilt. Im allgemeinen genügen für das Verfahren 1 bis 2 mg der NABS-ester, in einem Falle sogar 333 γ.
2. Das Verfahren wird an 4 Modellsubstanzen überprüft und in der Diskussion der Ergebnisse werden die Grenzen der Methode aufgezeigt. Auch wenn die Ergebnisse der Spaltung noch in dem einen oder anderen Fall durch eine Äquivalenzgewichtsbestimmung oder die Darstellung eines Derivates des hydrierten Alkohols zu ihrer Bestätigung ergänzt werden müssen, so wird doch insgesamt nicht mehr Substanz verbraucht als für eine C, H-Einzelbestimmung, man bekommt aber weitergehende Aufschlüsse über die Struktur. Die Darstellung und die Eigenschaften der u. a. als Modellsubstanzen benutzten NABS-ester des Crotonalkohols, des Petrosilinalkohols, des Linolenalkohols und des Linolalkohols werden erstmals beschrieben.
3. Als Spaltprodukte können nach den gemachten Voraussetzungen NABS-ester von ω-Hydroxy-carbonsäure-methylestern — geradkettige und methylverzweigte —, ω-Hydroxy-methylketone, Dicarbonsäuren, Monocarbonsäuren, Ketosäuren und Ketone entstehen. Die NABS-ester des Glykolsäure-methylesters, des β-Hydroxy-propionsäure-methylesters, des ε-Hydroxy-capronsäure-methylesters des ω-Hydroxy-nonansäure-methylesters, des α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylesters, des Hydroxy-acetons, des Butanol-(1)-on-(3) und des Pentanol-(1)-on-(4) werden erstmals beschrieben, sie dienen ebenso wie der NABS-ester des ω-Hydroxy-dekansäure-me-

thylesters als Referenzsubstanzen zur papierchromatographischen Identifizierung dieser Verbindungen.

4. Für die papierchromatographische Identifizierung der unter 3. genannten als Spaltprodukte zu erwartenden NABS-ester wird ein papierchromatographisches System aus n-Dekan (3) und wasserfreiem Pyridin (2) angegeben, in dem sie auf acetyliertem Papier Schleicher und Schüll 2043 b bei aufsteigendem Entwickeln gut getrennt werden können. In diesem System können auch die NABS-ester der geradkettigen Alkohole vom Methanol bis zum Octanol getrennt werden.
   Für die papierchromatographische Identifizierung geradkettiger und methylverzweigter Monocarbonsäuren von der Essigsäure bis zur Capronsäure wird ein System aus n-Octyl-alkohol (75), Wasser (75), Ameisensäure (25) und n-Heptan (5) angegeben, mit dem sie nach horizontalem Entwickeln in der Kammer von Strobel und Grassmann auf Schleicher und Schüll Papier 2043 b als Hydroxamate gut getrennt werden können.
5. Nach der oxydativen Spaltung des NABS-esters des Sexuallockstoffes des Seidenspinners können der NABS-ester des ω-Hydroxydekansäure-methylesters, Oxalsäure und Buttersäure identifiziert werden. Der Lockstoff ist demnach ein Hexadekadien-(10.12)-ol-(1). Dieser Befund wird durch weitere chemische und physikalische Daten gestützt.

Literaturverzeichnis

1. B. Götz, Experientia 7 (1951), 406.
2. Zusammenfassungen bei 1; A. Butenandt, Naturwissenschaftl. Rundschau 8 (1955), 457.
3. E. Hecker, Umschau (1959), 465.
4. A. Bethe, Naturwiss. 20 (1932), 177.
5. F. Verzar, Lehrbuch der inneren Sekretion, Liestal 1948, 1—16.
6. P. Karlson und A. Butenandt, Pheromones (ectohormones) in insects. Ann. Rev. Entomol. 4 (1959), 39.
   P. Karlson und M. Lüscher, Nature 183 (1959), 55; Naturwiss. 46 (1959), 63.
7. D. R. A. Wharton, G. L. Miller u. M. L. Wharton, J. Gen. Physiol. 37 (1954), 461.
8. C. G. Butler, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 147 (1957), 275.
9. R. Stumper, Mitt. schweiz. entomol. Ges. 19 (1956), 373.
10. M. Lüscher, Insectes Sociaux 3 (1956), 119.
11. Forster, J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom 30 (1951), 333.
12. K. v. Frisch, Zschr. vergl. Physiol. 29 (1941), 46.
13. A. Butenandt, R. Beckmann, D. Stamm und E. Hecker, Zschr. Naturforsch. 14b (1959), 283.
14. A. Butenandt, Jahrb. Preuß. Akademie d. Wissensch. 1939, 97; Angew. Chemie 54 (1941), 89.
15. E. Hecker, Chem. Ber. 88 (1955), 1666.
16. A. Butenandt, Nova Acta Leopoldina N. F. 17 (1955), 445.
17. E. Hecker, Proc. X. Internat. Congr. Entomology 2 (1956/58), 293.
18. W. Gerock, Dissertation Tübingen 1952.
19. D. Stamm, Diplomarbeit Tübingen 1957.
20. S. H. Bertram, Thesis Delft 1928, 139 ff.
21. Organic Synthesis, Second Edition Vol. I, 321, New York 1948.
22. Wallach, Ann. 312 (1900), 190.
23. A. Grün und Th. With, Chem. Ber. 55 (1922), 2215.
24. A. Butenandt und H. Rembold, Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 318 (1957), 284.
25. H. C. Brown und C. B. Subba Rao, J. Amer. chem. Soc. 78 (1956), 2582.
26. Organic Synthesis Vol. II, 279.
27. F. Margnoy, Bulletin de la Société Chimiqui de France (3) 33 (1905), 542.
28. Organic Synthesis Vol. II, 5.
29. F. Arndt, L. Loewe und M. Ozansoy, Chem. Ber. 73 (1940), 779.
30. E. J. Salmi, Chem. Ber. 71 (1938), 1805.
31. Nystrom und Brown, J. Amer. chem. Soc. 69 (1947), 2548.

32. W. G. Brown, Redactions by $LiAlH_4$, in Organic Reactions VI, 488.
33. L. Willimann und H. Schinz, Helv. Chim. Acta 32 (1949), 2159.
34. N. D. Zelinsky und E. F. Dengin, Chem. Ber. 55 (1922), 3357.
35. Organic Synthesis Vol. II, 279.
36. Organic Synthesis Vol. III, 619.
37. Organic Synthesis Vol. III, 591.
38. K. S. Markley, Fatty acids, New York 1947, S. 406—410.
39. E. Erdmann und Mitarb., Ber. 42 (1909), 1334.
40. D. T. Mowry und Mitarb., J. biol. Chem. 142 (1942), 679.
41. A. T. James und J. Webb, Biochem. J. 66 (1957), 515.
42. R. Markham, Biochem. J. 36 (1942), 70.
43. entfällt
44. Organic Synthesis Vol. I, 361.
45. Organic Synthesis Vol. II, 416.
46. C. G. Overberger und Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 74 (1952), 3290.
47. F. Micheel und H. Schweppe, Angew. Chem. 66 (1954), 136.
48. A. R. Thompson, Aust. J. Sci. Res. B 4 (1951), 180 ff.; B 4, 285 ff.
49. H. Kalbe, Hoppe Seyler's Zschr. Physiol. Chem. 297 (1954), 19.
50. R. Strobel, Dissertation München 1957.
51. F. Micheel und H. Schweppe, Naturwiss. 39 (1952), 380; Mikrochem. Acta 53 (1954), 53.
52. F. A. Isherwood und C. S. Hanes, Biochem. J. 55 (1953), 824.
53. A. G. Long, J. R. Quayle und R. J. Stedman, J. chem. Soc. (London) 1951, 2197.
54. H. Schweppe, Dissertation Münster 1954, referiert in H. F. Linskens, Papierchromatographie in der Botanik, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955, 91.
55. G. Kun und M. Garcia Herandez, Biochemica et Biophysica Acta 23 (1957), 181; A. Meister und P. A. Abendschein, Anal. Chem. 28 (1956), 171.
56. M. Calvin, Isotopic Carbon, New York 1949, 130 ff.
57. N. D. Cheronis, Micro und Semimicro Methods in A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry Vol. VI, New York 1954.
58. M. Kerschbaum, Ber. dtsch. chem. Ges. 46 (1913), 1732.
59. C. Harries und R. Haarmann, Chem. Ber. 46 (1913), 1738.
60. D. Zayed, unveröff. Versuche.
61. J. Tischer, Ber. 72 (1939), 291.
62. W. D. Celmer und I. A. Solomons, J. Amer. chem. Soc. 75 (1953), 1372.
63. A. Butenandt, E. Hecker und H. G. Zachau, Chem. Ber. 88 (1955), 1372.
64. L. und A. Kofler, Thermomikromethoden, Weinheim 1954.
65. Brockmann, Ber. 74 (1941), 73.
66. F. Drakowzal u. H. König, Österr. Chemiker. Ztg. 55 (1954), 189.
67. Th. Zerewitinoff, Ber. 47 (1914), 2418.
68. BASF. D. P. Anm. B 25 953.
69. Houben-Weyl, 4. Aufl. Bd. 2, Analytische Methoden, Stuttgart 1953, 448.

Lebenslauf

Meine Eltern sind der Arzt Dr. med. Ludwig Stamm und seine Ehefrau Karoline, geborene Stroh.

Am 6. Oktober 1924 wurde ich zu Kirn an der Nahe geboren. Die Kinderjahre und die Schulzeit verbrachte ich in Frankfurt/Main und Darmstadt. Im März 1943 bestand ich die Reifeprüfung an der Ludwigs-Oberschule in Darmstadt mit „gut".

Infolge einer Poliomyelitis anterior war ich wehruntauglich und mußte vor und während des Studiums Kriegshilfsdienst leisten.

Zum Sommersemester 1944 schrieb ich mich in Frankfurt als Student der Medizin ein. Das Physikum bestand ich im März 1947 mit „sehr gut". Im Sommer 1950 legte ich das Staatsexamen als Arzt mit der Note „sehr gut" ab und promovierte an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt mit einer Arbeit über die „Zytologische Krebsdiagnose aus dem Scheiden- und Cervikal-Abstrich" zum Doktor der Medizin mit dem Prädikat „mit Auszeichnung".

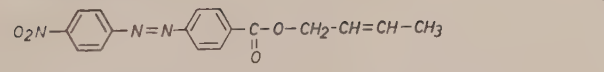
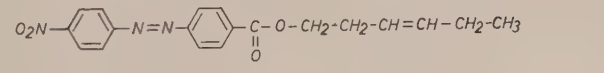
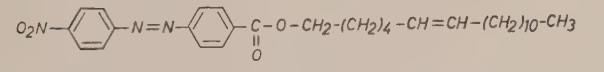
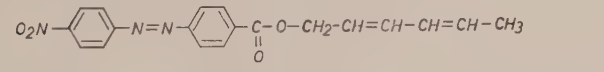
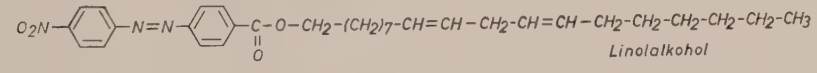
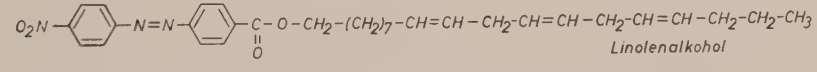
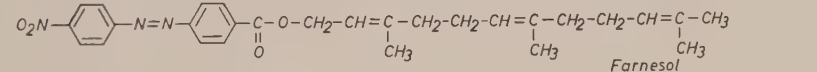
Die Pflichtassistentenzeit verbrachte ich am Elisabethenstift in Darmstadt und erhielt daraufhin im Dezember 1951 die endgültige Bestallung als Arzt.

Im Herbst 1953 bestand ich an der Technischen Hochschule in Darmstadt die Vorprüfung für Diplom-Chemiker. Von da an studierte ich in Tübingen, legte dort die Diplomprüfung ab und begann am Max-Planck-Instiut für Biochemie eine Arbeit „Modellversuche zur Strukturaufklärung des Sexuallockstoffes des Seidenspinners", die mit „sehr gut" bewertet wurde. Das Diplom als Chemiker wurde mir von der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät in Tübingen am 30. März 1957 ausgestellt. Anschließend arbeitete ich am Max-Planck-Institut für Biochemie in München eine Mikromethode zur Strukturaufklärung ungesättigter Alkohole aus und wandte sie auf den Sexuallockstoff des Seidenspinners, das Bombykol, an. Sie ist in der vorliegenden Dissertation dargestellt.

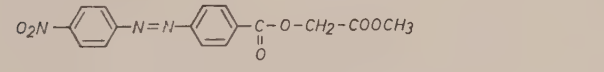
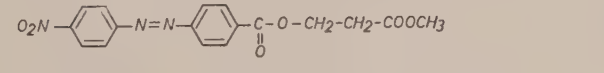
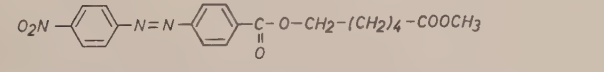
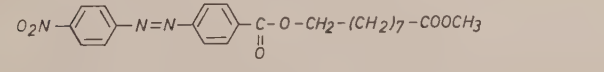
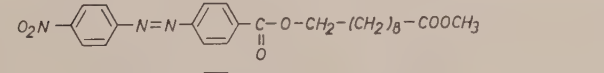
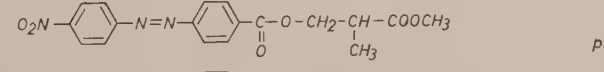
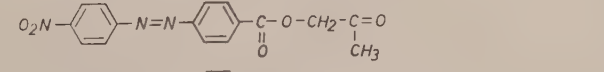
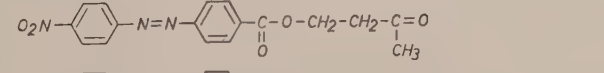
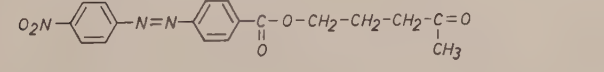
Seit Anfang 1959 bin ich Mitglied der Schriftleitung der Deutschen Medizinischen Wochenschrift.

Am 9. Oktober 1956 heiratete ich Gertraud Niepmann. Sie schenkte mir zwei Söhne, Hartmuth und Burkhard.

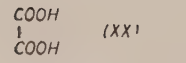
Modellsubstanzen

		NABS-ester des
(I)		Crotonalkohol
(II)		Hexen-(3)-ol-(1)
(III)		Petrosilinalkohol
(IV)		Sorbinol
(V)		Linolalkohol
(VI)		Linolenalkohol
(VII)		Farnesol

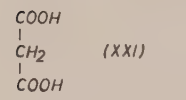
Spaltprodukte

		NABS-ester des
(VIII)		Glykolsäure-methylester
(IX)		β-Hydroxy-propionsäure-methylester
(X)		ε-Hydroxy-capronsäure-methylester
(XI)		ω-Hydroxy-nonansäure-methylester
(XII)		ω-Hydroxy-decansäure-methylester
(XIII)		α-Methyl-β-hydroxy-propionsäure-methylester
(XIV)		Hydroxy-aceton
(XV)		Butanol-(1)-on-(3)
(XVI)		Pentanol-(1)-on-(4)

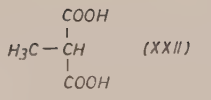
Dicarbonsäuren

 (XX)

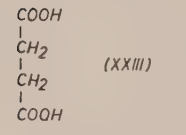
Oxalsäure

 (XXI)

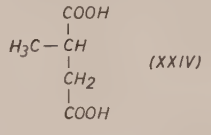
Malonsäure

 (XXII)

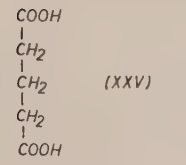
Methyl-malonsäure

 (XXIII)

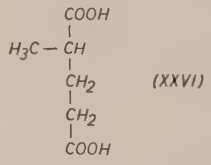
Bernsteinsäure

 (XXIV)

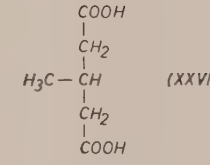
α-Methyl-bernsteinsäure

 (XXV)

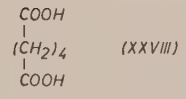
Glutarsäure

 (XXVI)

α-Methyl-glutarsäure

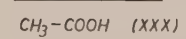
 (XXVII)

β-Methyl-glutarsäure

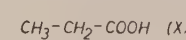
 (XXVIII)

Adipinsäure

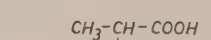
Monocarbonsäuren

 (XXX)

Essigsäure

 (XXXI)

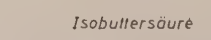
Propionsäure

 (XXXII)

Isobuttersäure

(XXXIII)

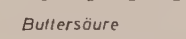
Buttersäure

 (XXXIV)

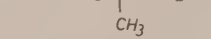
β-Methyl-buttersäure

(XXXV)

α-Methyl-buttersäure

 (XXXVI)

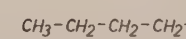
Valeriansäure

 (XXXVII)

γ-Methyl-valeriansäure

(XXXVIII)

β-Methyl-valeriansäure

 (XXXIX)

Capronsäure

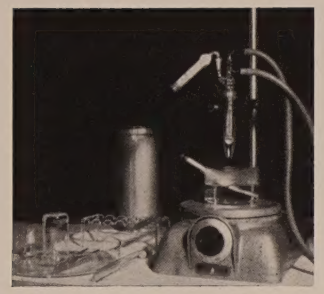


Abb. 4. Die oxydative Spaltung (1)

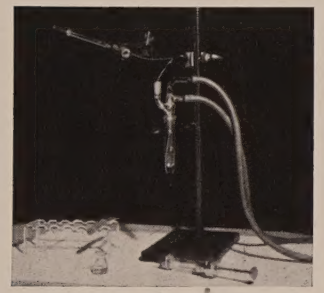


Abb. 6. Die Zerstörung von unverbrauchtem $KMnO_4$ mit Ameisensäure (2b)

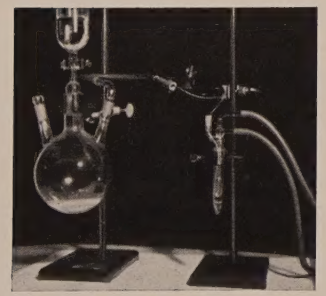
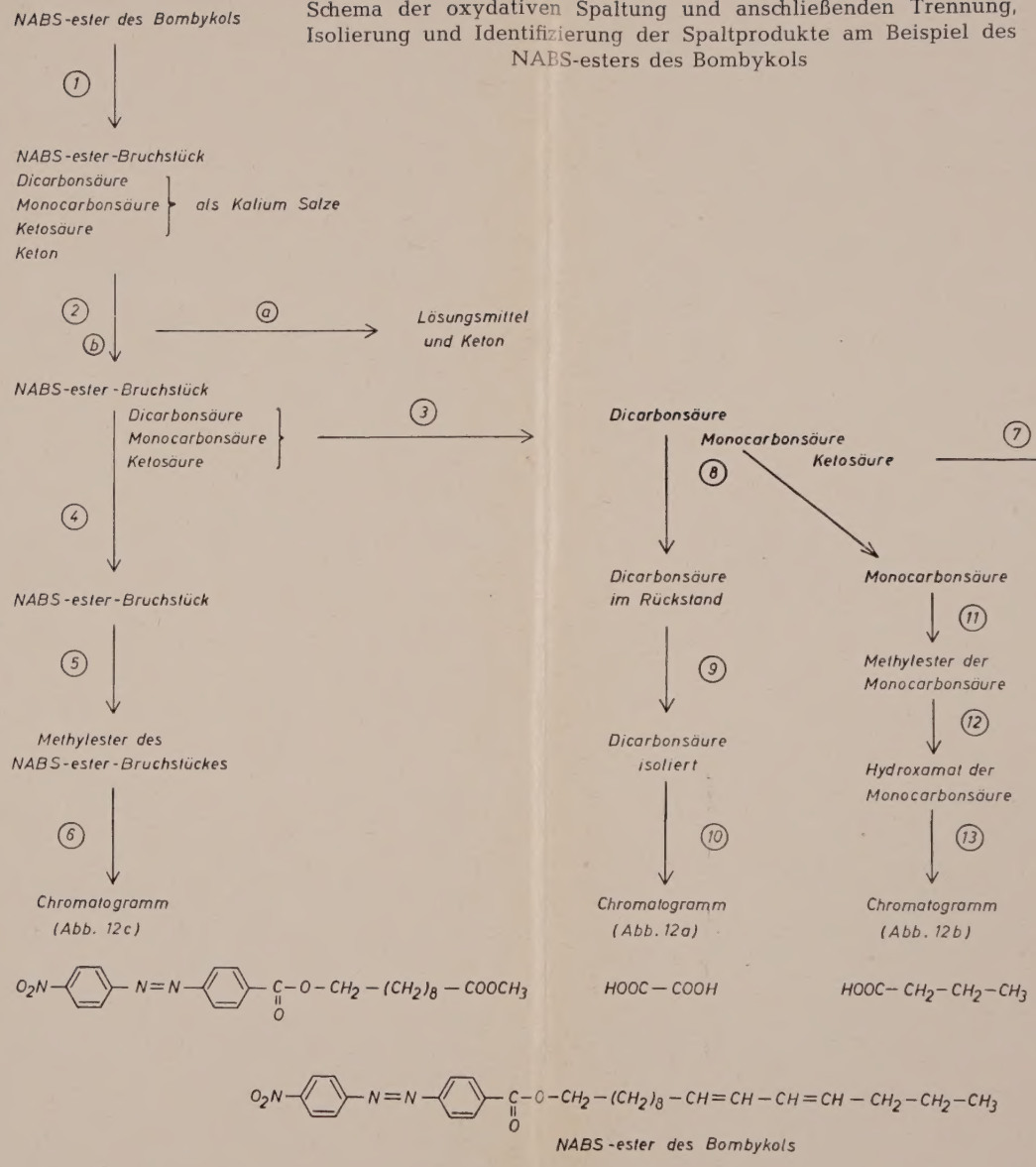


Abb. 7. Die Zerstörung von Braunstein mit SO_2 (4)

Schema der oxydativen Spaltung und anschließenden Trennung, Isolierung und Identifizierung der Spaltprodukte am Beispiel des NABS-esters des Bombykols



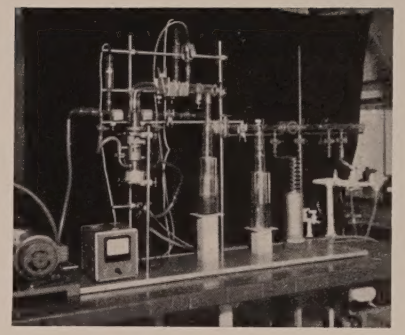


Abb. 5. Das Abdestillieren des Lösungsmittels und der Ketone im Vakuum (2a)

Abb. 8. Wasserdampfdestillation zur Abtrennung der Monocarbonsäure (8)

Druck: Druckhaus Dörr K.-G. · Ludwigsburg